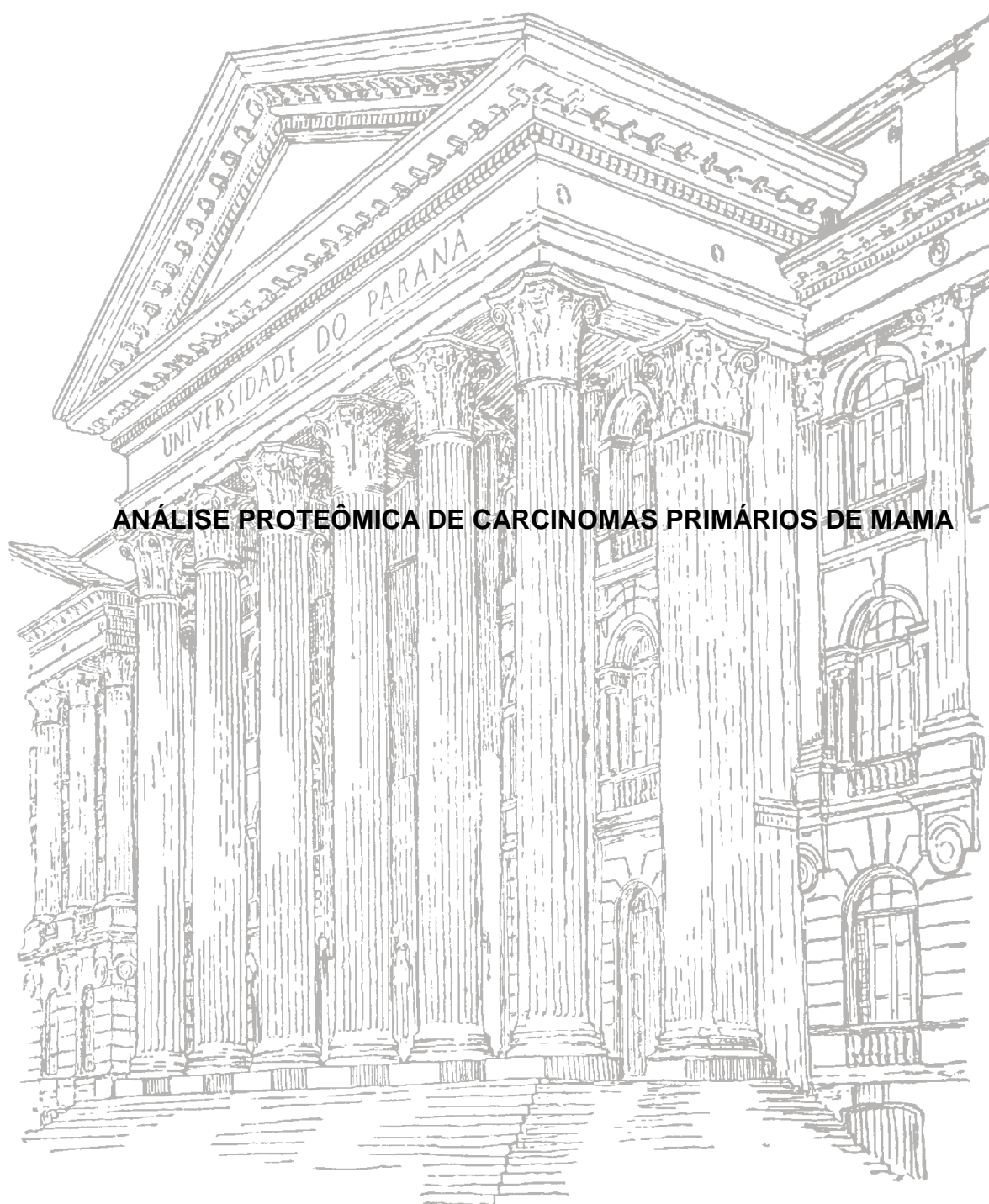


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RODRIGO KAVISKI



ANÁLISE PROTEÔMICA DE CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA

CURITIBA

2010

RODRIGO KAVISKI

ANÁLISE PROTEÔMICA DE CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Iglenir João Cavalli

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro

CURITIBA

2010

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Kaviski, Rodrigo

Análise proteômica de carcinomas primários de mama. / Rodrigo Kaviski. – Curitiba, 2010.
118 f. ; 30cm.

Orientador: Iglénir João Cavalli

Co-orientador: Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro

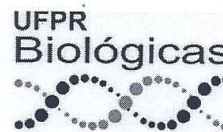
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação Genética.

1. Mamas - Câncer 2. Proteômica I. Título II. Cavalli, Iglénir João III. Ribeiro, Enilze Maria de Souza Fonseca IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 616.99449



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **RODRIGO KAVISKI** para fins de obter o título de Mestre em Ciências Biológicas na Área de Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito “A”.

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 30 de abril de 2010

Prof. Dr. Cícero Andrade Urban – Universidade Positivo
Membro Titular

Profª Drª Roseli Wassem – UFPR
Membro Titular

Prof. Dr. Ricardo Lehtonen R. Souza – UFPR
Membro Titular

Prof. Dr. Iglénir João Cavalli – UFPR
Orientador e Presidente da Banca Examinadora

Visto:

Profª Drª Maria Luiza Petzl-Erler

Dedico este trabalho a toda minha família. Mas especialmente dedico à pessoa que mais se esforçou, mais se dedicou, mais lutou e nunca desistiu, a minha mãe *Dayse*.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos professores e *orientadores*, Prof. Dr. Iglénir João Cavalli e Prof^a. Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro, pela confiança e pela oportunidade de trabalhar em algo novo e desafiador, por todas as palavras de incentivo e apoio, pela amizade, por todos os ensinamentos, e por serem exemplos de como um pesquisador tem que exercer sua profissão.

À minha *banca* de acompanhamento e de defesa, Prof. Dr. Silvio Marques Zanata, Prof^a. Dra. Roseli Wassem, Prof. Dr. Cícero Andrade Urban, Prof. Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza e Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza. Obrigado pela paciência, disponibilidade e atenção em relação às sugestões e correções. A participação de vocês foi fundamental para o desenvolvimento, conclusão e qualidade deste trabalho.

Ao *amigo* Luiz Eduardo Rizzo de Souza pelo envolvimento desde o início deste trabalho, pela paciência, dedicação e por todos os ensinamentos transmitidos.

Aos meus *amigos* do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, pela convivência, companheirismo e amizade em todos os momentos, e por tornarem sempre acolhedor e agradável o ambiente de trabalho.

A todos os professores, funcionários e amigos do Departamento de Genética, Patologia Básica e Bioquímica por tudo que aprendi e pelas novas amizades.

A todos os meus amigos e amigas, especialmente ao Gustavo, Márcio e Marcos, pela amizade e companheirismo ao longo desses anos.

A minha *família*, especialmente minha mãe, pelo amor que sempre tiveram comigo, sempre acompanhando os meus passos, pelas palavras de incentivo, apoio e carinho, por serem pessoas brilhantes e serem exemplos de dedicação, humildade, perseverança e nunca desistirem.

**“O mundo é um lugar perigoso de se viver,
não por causa daqueles que fazem o mal,
mas sim por causa daqueles que observam
e deixam o mal acontecer”**

Albert Einstein

RESUMO

O câncer é resultante do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem em genes que atuam no controle do ciclo celular desencadeando uma proliferação celular desordenada. O câncer de mama é o segundo mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres, apresentando alta mortalidade, principalmente devido à detecção tardia da doença. A tumorigênese mamária é um evento extremamente complexo que envolve múltiplos fatores, incluindo hormônios e agentes físicos, químicos e ambientais. Diferentes proteínas podem estar envolvidas no processo, sendo super expressas ou sub-expressas, conduzindo a funções celulares distintas. A metodologia proteômica possui diversas aplicações, entre elas a identificação e validação de biomarcadores, utilizados para uma melhor compreensão, detecção e tratamento do câncer. O objetivo deste trabalho foi analisar seis amostras de carcinomas primários de mama pelo método proteômico, fornecendo dados para análise diferencial com o tecido normal adjacente. A análise dos géis bidimensionais foi realizada no programa *ImageMaster™ 2D Platinum v6.0* (GE Healthcare). Oitenta bandas foram removidas manualmente e submetidas à identificação por PMF na plataforma MASCOT (<http://www.expasy.org/tools/>). Destas, 57 (71,25%) foram identificadas, resultando em 44 proteínas diferentes. Com base na literatura e nos bancos de dados *UniProtKB/ Swiss-Prot* e NCBI as proteínas foram distribuídas em onze categorias de acordo com suas funções biológicas: citoesqueleto e proteínas associadas (25%), chaperonas moleculares/proteínas *heat shock* (14%), proteínas membrana-associadas com múltiplas atividades (4%), biossíntese de proteínas (2%), biossíntese de nucleotídeos (2%), crescimento celular e regulação da proliferação (11%), degradação protéica (5%), detoxificação e proteínas redox (11%), proteínas com função de ligação (16%), enzimas metabólicas (5%) e proteínas com outras funções (5%). Dentre as proteínas identificadas, muitas apresentam funções associadas a mecanismos moleculares envolvidos na tumorigênese do câncer de mama como, regulação da divisão celular, organização do citoesqueleto, detoxificação de carcinógenos, diferenciação, adesão e apoptose. Entretanto para a comprovação desta relação é importante o estudo diferencial da expressão destas proteínas. As informações obtidas neste trabalho são revelantes para a caracterização proteômica de carcinomas primários de mama e posterior análise comparativa com o tecido mamário normal.

Palavras-Chave: Câncer de mama. Proteômica. Eletroforese bidimensional.

ABSTRACT

Cancer results from the accumulation of genetic and epigenetic changes that occur in genes acting in cell cycle control triggering an uncontrolled cell proliferation. Breast cancer is the second most frequent in the world and the most common among women, presenting high mortality mainly due to the late detection of the disease. The mammary tumorigenesis is an extremely complex event that involves multiple factors, including hormones and physical, chemical and environmental agents. Different proteins may be involved in the process, being overexpressed or under-expressed, leading to distinct cellular functions. The proteomics methodology has several applications, including the identification and validation of biomarkers, used for better understanding, detection and treatment of cancer. The objective of this study was to analyze six samples of primary breast carcinomas by proteomic method, providing data for differential analysis with the adjacent normal tissue. The 2-D gel electrophoresis was analyzed with ImageMasterTM 2D Platinum v6.0 (GE Healthcare). Eighty spots were removed and submitted to identification by Peptide Mass Fingerprinting (PMF) on platform MASCOT (<http://www.expasy.org/tools/>). 57 spots (71.25%) were identified, resulting in 44 different proteins. Based on the literature and UniProtKB/ Swiss-Prot and NCBI databases, the proteins were divided into eleven categories according to their biological functions: cytoskeleton and associated proteins (25%), molecular chaperones/ heat shock proteins (14%), membrane-associated proteins with multiple activities (4%), protein biosynthesis (2%), nucleotide biosynthesis (2%), cell growth and proliferation regulators (11%), protein degradation (5%), detoxification and redox proteins (11%), proteins with binding function (16%), metabolic enzymes (5%) and proteins with other functions (5%). Among the identified proteins, many have functions associated with molecular mechanisms involved in tumorigenesis of breast cancer as regulation of cell division, cytoskeletal organization, detoxification of carcinogens, differentiation, adhesion, and apoptosis. But to prove this relationship is important to study the differential expression of these proteins. The information obtained in this study is relevant to the proteomic characterization of primary breast carcinomas and subsequent comparative analysis with the normal breast tissue.

Keywords: Breast cancer. Proteomics. 2-D gel electrophoresis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADRO 01	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	33
QUADRO 02	PROGRAMA PARA O <i>Ettan IPGphor II</i>	36
FIGURA 01	GEL UNIDIMENSIONAL.....	41
FIGURA 02	GEL BIDIMENSIONAL DE TECIDO MAMÁRIO TUMORAL.....	42
QUADRO 03	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DAS AMOSTRAS.....	44
QUADRO 04	NÚMERO DE BANDAS DETECTADAS NOS GÉIS BIDIMENSIONAIS.....	44
FIGURA 03	TRIPLICATA DA AMOSTRA CP 645.....	45
FIGURA 04	GÉIS DE REFERÊNCIA DAS AMOSTRAS DE TECIDO MAMÁRIO TUMORAL....	46
QUADRO 05	RELAÇÃO DAS BANDAS DETECTADAS EM PELO MENOS 3 AMOSTRAS.....	50
FIGURA 05	ESPECTROS DE MASSAS.....	51
FIGURA 06	GEL BIDIMENSIONAL DA AMOSTRA CP 645 COM PROTEÍNAS IDENTIFICADAS.....	57
GRÁFICO 01	CLASSIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS.....	58
FIGURA 07	DETALHE DAS BANDAS DA PROTEÍNA ACTINA CITOPLASMÁTICA 1 E 2.....	65
FIGURA 08	DETALHE DAS BANDAS DA PROTEÍNA VIMENTINA.....	66
FIGURA 09	DETALHE DAS BANDAS DAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA DAS TROPOMIOSINAS.....	70
FIGURA 10	DETALHE DAS BANDAS DA PROTEÍNA <i>HEAT SHOCK</i> BETA-1.....	73
FIGURA 11	DETALHE DAS BANDAS DA PROTEÍNA SOROTRANSFERRINA.....	90
FIGURA 12	DETALHE DAS BANDAS DA PROTEÍNA ALFA-1 ANTITRIPSINA.....	94
FIGURA 13	DETALHE DAS BANDAS DA CADEIA ALFA-1 DO COLÁGENO VI.....	98

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 -	RELAÇÃO DO MÉTODO DE BRADFORD COM O TAMPÃO DE LISE.....	43
TABELA 02 -	RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl: Microlitro

x g: Gravidade

2D: Bidimensional

2D-PAGE: Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

BSA: Albumina de soro bovino

CHAPS: Ciclohexilamino dimetilamônio propano sulfonato

Da: Dalton

DCIS: Carcinoma ductal *in situ*

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DTT: Ditioneitol

EGF: Fator de crescimento epidermal

ESI: Ionização por eletrodispensão

FGF: Fator de crescimento de fibroblasto

g: Grama

GTP: Guanosina trifosfato

GTPase: Enzimas que hidrolisam GTP

h: Hora

HCCA: Ácido α-ciano-4-hidroxibenzoico

ID: Identificação das bandas no gel

IEF: Focalização isoeletrica

IGF: Fator de crescimento semelhante à insulina

INCA: Instituto Nacional do Câncer

IPG: Gradiente de pH imobilizado

kDa: Quilodalton

kV: Quilovolts

LCIS: Carcinoma lobular *in situ*

LMW: Marcador de massa molecular

mA: Miliampère

MALDI: Desorção por *laser* ionizante assistida por uma matriz

mg: Miligrama

min: Minuto

ml: Mililitro

mM: Milimolar

MM: Massa molecular

MPT: Modificação pós-traducional

MS: Espectrometria de massa

MS/ MS: Espectrometria de massa em *tandem*

m/ z: Razão Massa Carga

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

ng: Nanograma

ns: Nano segundos

pI: Ponto isoelétrico

PMF: Impressão digital de peptídeos (*peptide mass fingerprinting*)

PMSF: Fluoreto de fenil-metil-sulfonilo

ppm: Partes por milhão

RNA: Ácido Ribonucléico

SDS: Dodecil-sulfato de sódio

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio

ToF: Tempo de voo

Δ MM: Variação entre a massa molecular observada e a teórica

Δ pI: Variação entre o ponto isoelétrico observado e o teórico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 CÂNCER DE MAMA.....	16
2.1.1 Fatores de Risco.....	20
2.2 ERA PÓS-GENÔMICA: PROTEÔMICA.....	22
2.2.1 Eletroforese Bidimensional em Gel de Poliacrilamida (2D-PAGE).....	25
2.2.2 Espectrometria de Massa.....	27
2.2.3 Aplicações da Proteômica.....	28
3. JUSTIFICATIVA.....	31
4. OBJETIVOS.....	32
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	33
5.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	33
5.2.1 Coleta do material biológico e armazenamento das amostras.....	33
5.2.2 Extração de proteínas.....	34
5.2.3 Quantificação de proteínas.....	34
5.3 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2D-PAGE).....	35
5.3.1 Reidratação das tiras (<i>strips</i>) e Focalização Isoelétrica (IEF).....	35
5.3.2 Equilíbrio das tiras.....	36
5.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).....	36
5.4 COLORAÇÃO, DIGITALIZAÇÃO E ANÁLISE COMPUTACIONAL.....	37
5.5 ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	38
5.5.1 Preparo das amostras.....	38
5.5.2 Obtenção e análise dos espectros de massa.....	39
5.5.3 Identificação das proteínas.....	39
6. RESULTADOS.....	41
6.1 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO TECIDO MAMÁRIO TUMORAL.....	41
6.2 ANÁLISE E DETECÇÃO DAS BANDAS DOS GÉIS BIDIMENSIONAIS.....	44
6.3 IDENTIFICAÇÃO PROTÉICA.....	49

7. DISCUSSÃO.....	59
7.1 IMPLANTAÇÃO DA METODOLOGIA PROTEÔMICA.....	59
7.2 ANÁLISE DOS ESPECTROS DE MASSA.....	60
7.3 PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POSITIVAMENTE.....	61
7.4 MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS (MPT).....	61
7.5 CLASSIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	62
7.5.1 Citoesqueleto e proteínas associadas.....	63
7.5.2 Chaperonas moleculares/ proteínas <i>heat shock</i>	72
7.5.3 Proteínas membrana-associadas com múltiplas atividades.....	77
7.5.4 Biossíntese de proteínas.....	79
7.5.5 Biossíntese de nucleotídeos.....	80
7.5.6 Crescimento celular e regulação da proliferação.....	81
7.5.7 Degradação protéica.....	84
7.5.8 Detoxificação e proteínas redox.....	85
7.5.9 Proteínas com função de ligação.....	89
7.5.10 Enzimas metabólicas.....	96
7.5.11 Proteínas com outras funções.....	97
8. CONCLUSÕES.....	99
REFERÊNCIAS.....	100
APÊNDICE.....	114
ANEXOS.....	116

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença multifatorial resultante do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas em genes envolvidos no controle do ciclo celular desencadeando uma proliferação celular desordenada (PÉREZ-LÓPEZ *et al.*, 2009).

O carcinoma mamário é a neoplasia mais comum que afeta mulheres nos países ocidentais. A cada ano, cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama (INCA/MS, 2010). São conhecidos diversos fatores de risco que aumentam a suscetibilidade ao câncer de mama, como o fumo, exposição à radiação ionizante, obesidade, envelhecimento e principalmente os fatores reprodutivos (idade da menarca e da menopausa, número de filhos, idade da primeira gravidez).

Para elucidar os mecanismos moleculares no câncer de mama – como a proliferação desordenada das células cancerígenas e o processo metastático – trabalhos vêm sendo realizados nos últimos anos na área da proteômica, que tem como objetivos principais a compreensão dos mecanismos de progressão do câncer e a identificação de novos alvos terapêuticos.

Análises proteômicas, comparando amostras de carcinomas mamários e de tecidos normais, demonstraram que determinadas proteínas apresentam uma expressão diferenciada nestes tecidos, sugere-se que tais modificações de expressão podem desempenhar um importante papel na tumorigênese do câncer de mama (HONDERMARCK *et al.*, 2008). As proteínas, que apresentam um aumento de expressão no tecido tumoral, podem ser utilizadas como potenciais biomarcadores, auxiliando na detecção e diagnóstico precoce da doença.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O câncer se constitui em um conjunto de centenas de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo alcançar outras regiões do corpo (metástases). Dividindo-se rápida e descontroladamente, estas células formam tumores, termo genérico que indica um aumento anormal de uma parte ou da totalidade de um tecido. Ao falarmos em tumor, podemos estar nos referindo a uma neoplasia maligna ou benigna. Neoplasia é o acúmulo anormal de células, que ocorre devido a um desequilíbrio entre proliferação e morte celular (NUSSBAUM *et al.*, 2001). Um tumor benigno corresponde a uma massa localizada de células com taxa de proliferação aumentada e que se assemelha ao tecido adjacente (células diferenciadas). Um tumor maligno geralmente apresenta maior taxa de proliferação do que o benigno, diferenciação morfológica variável (células bem diferenciadas a indiferenciadas), capacidade de invasão no tecido normal e metastatização.

O câncer é atualmente compreendido como uma doença multifatorial com alterações genéticas e epigenéticas (PÉREZ-LÓPEZ *et al.*, 2009), que ocorre pelo acúmulo de mutações em genes que controlam o crescimento e a diferenciação celular. As mutações se acumulam ao longo dos anos, até que a célula perde seus mecanismos de controle do crescimento e inicia um tumor (SUGIMURA, 1998).

Entre as principais mutações estão as de ganho ou perda de função. Nas mutações de ganho de função a proteína mutante adquire novas características, como ocorre na ativação de oncogenes, em que a proteína codificada (oncoproteína) geralmente tem sua função aumentada. Nas mutações de perda de função ocorre a perda de função de ambos os alelos de um gene (por mutação, deleção ou silenciamento epigenético), e a proteína resultante não é sintetizada, ou é sintetizada em uma taxa pequena, insuficiente para desempenhar sua função biológica. Um exemplo são as mutações em ambos os alelos de um gene supressor de tumor (NUSSBAUM *et al.*, 2001).

Os oncogenes representam formas alteradas dos proto-oncogenes celulares normais que controlam uma variedade de processos associados com o crescimento, proliferação e diferenciação celular (BISHOP, 1985; GORDON, 1985; WEINBERG, 1985). A ativação dos oncogenes celulares pode dar-se por alterações reguladoras,

estruturais ou por mutações de ponto. Como consequência dessas alterações, a expressão dos oncogenes comanda a proliferação anormal das células e a formação do tumor (COOPER, 1994). Outros genes de grande importância no câncer são os supressores de tumor. Alterações que inativem estes genes liberam a célula da inibição regulada pelos mesmos em determinadas fases do ciclo celular (pontos de checagem), resultando numa proliferação desordenada, característica da célula cancerosa (WEINBERG, 1991).

Acredita-se que o acúmulo de alterações genéticas seja responsável pela progressão de células normais a estágios hiperplásicos e displásicos, destes em câncer invasivo e finalmente em doença metastática (GARNIS *et al.*, 2004). Muitas das alterações moleculares encontradas no câncer de mama invasivo estão presentes em lesões precursoras, corroborando a hipótese de que o câncer de mama desenvolve-se pelo acúmulo gradual de mutações genéticas (MAITRA *et al.*, 2001).

2.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o segundo mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres. A cada ano, cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama. Estima-se, que no ano de 2010, ocorrerão 489.270 novos casos de câncer no Brasil, sendo que o de mama é o segundo mais incidente entre a população feminina, responsável por 49.240 novos casos. Dados para o Estado do Paraná em 2010 estimam 2.990 casos novos de câncer de mama, e para Curitiba são estimados 730 casos novos (INCA/MS, 2010).

O sintoma mais comum do câncer de mama é o aparecimento de nódulo, geralmente indolor, duro e irregular, mas há tumores que são de consistência branda, globosos e bem definidos. Podem surgir alterações na pele que recobre a mama, como abaulamentos ou retrações ou um aspecto semelhante a casca de uma laranja e podem também surgir nódulos palpáveis na axila (INCA/MS, 2010).

Os mais importantes procedimentos para o rastreamento e detecção precoce do câncer de mama são técnicas de imagem: mamografia, ultrassonografia e ressonância magnética. Infelizmente, mais de 20% dos novos casos da doença não são detectados por estes métodos, indicando a necessidade de identificação de

novos marcadores moleculares, que proporcionem detecção e diagnóstico mais eficazes (PIETROWSKA *et al.*, 2009).

Existe uma variação regional na incidência e mortalidade do câncer de mama no Brasil, onde as regiões mais desenvolvidas apresentam as maiores taxas. Isto sugere que o ambiente e/ ou estilo de vida podem influenciar na incidência desta doença (INCA/MS, 2010). Mas também, as regiões mais desenvolvidas apresentam melhores recursos diagnósticos e melhores informações em atestados de óbitos, o que pode estar influenciando no aumento da taxa de incidência e de mortalidade de câncer de mama nestas regiões.

Apesar de ser considerado como um câncer de prognóstico bom, se diagnosticado e tratado precocemente, as taxas de mortalidade continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença, em geral, seja diagnosticada em estágios avançados (estádio III e IV). Investimentos tecnológicos e em recursos humanos no âmbito de um programa estruturado para detecção precoce desta neoplasia, e a implementação de um sistema nacional de informações constituem estratégias importantes no sentido de reverter este cenário (INCA/MS, 2010).

A tumorigênese do câncer de mama é um evento extremamente complexo que envolve múltiplos fatores, incluindo hormônios, mutações genéticas e vários agentes físicos, químicos e ambientais (DENG *et al.*, 2006). Diferentes proteínas podem estar envolvidas no processo, sendo super expressas ou sub-expressas simultaneamente e conduzindo a funções celulares distintas (LUO *et al.*, 2005).

Embora o câncer de mama venha sendo extensivamente estudado nas últimas décadas, os mecanismos moleculares não são plenamente compreendidos (DENG *et al.*, 2006).

Sabe-se, entretanto, que os eventos moleculares que conduzem à carcinogênese das células epiteliais da mama envolvem modificações na estrutura e expressão tanto de oncogenes quanto de genes supressores de tumor (como *MYCC*, *ERBB2* e *TP53*), conduzindo a um crescimento desordenado caracterizado por altas taxas de proliferação e eventual migração. Contudo, os tumores mamários se desenvolvem lentamente; foi estimado que são necessários de seis a oito anos para que um tumor, originado de uma célula, atinja 1 cm de tamanho. Este fato realça a importância da regulação endócrina e parácrina do crescimento celular no desenvolvimento do tumor. O crescimento das células no câncer de mama esta sob

o controle de hormônios estrogênicos ou estrogênios (estradiol e progesterona) e fatores de crescimento (HODERMARCK *et al.*, 2002).

O desenvolvimento da mama na puberdade e durante a maturidade sexual é estimulado pelo estrogênio 17β -estradiol (E2), que é o esteróide predominante na circulação e o mais importante para o tecido mamário. O estrogênio estimula a divisão celular no tecido mamário, o que pode aumentar o risco de ocorrência de danos permanentes ao DNA (CHABNER e MURPHY, 2005).

Atualmente, uma das esperanças para os pacientes com câncer de mama são as terapias anti-hormonais, que têm como objetivo impedir o crescimento das células tumorais através do bloqueio de receptores hormonais específicos. Um dos exemplos é o *tamoxifeno*, um anti-estrogênio utilizado no tratamento do câncer de mama. Contudo, algumas células tumorais não são dependentes de estrogênios para seu crescimento, e sua agressividade é muito maior (HODERMARCK *et al.*, 2002).

Alem dos hormônios estrogênicos, o crescimento das células no câncer de mama pode ser regulado por vários fatores de crescimento que controlam a proliferação, a migração e a apoptose, como por exemplo, o fator de crescimento semelhante à insulina (*IGF-I*) ou o fator de crescimento epidermal (*EGF*) que estimulam a proliferação das células no câncer de mama (HODERMARCK *et al.*, 2002).

Por estas razões, a caracterização molecular do câncer requer abordagens eficazes para a análise da complexidade desta doença, isto é, capazes de analisar a expressão de uma variedade de genes de um modo simples e reproduzível (LUO *et al.*, 2005).

A mama é formada por dois compartimentos: a porção glandular, que é envolvida na produção e transporte do leite, e o estroma e tecidos conectivos. A porção glandular mamária é composta por 15-20 lobos, e em cada um deles existem diversos lóbulos menores que terminam em dezenas de minúsculos bulbos ou ácinos que produzem leite. Os lóbulos são ligados por finos tubos chamados de ductos, e estes conduzem ao mamilo. Os ductos e lóbulos são formados por células epiteliais, cuja principal função é a produção e secreção de vários constituintes do leite. Estas células epiteliais são rodeadas por uma camada de células mioepiteliais, fixadas em uma membrana basal, cuja função é manter a estrutura tubular dos ductos e lóbulos. Ao redor destes, os tecidos conectivos são compostos de

fibroblastos, células endoteliais e adipócitos. Além disso, estão presentes vasos sangüíneos e linfáticos que irrigam a glândula mamária, além das fibras nervosas, principalmente sensoriais e simpáticas (HONDERMARCK, 2003). Todas estas células, juntamente com a porção estromal, produzem os componentes da matriz extracelular, que com hormônios e fatores de crescimento são essenciais para o desenvolvimento, funcionamento e morfogênese da glândula mamária (NANDI *et al.*, 1995).

A mama sofre mudanças cíclicas tanto pelo ciclo menstrual quanto pelos processos de gestação/ lactação. Para adquirirem sua funcionalidade, as células epiteliais devem receber sinais adequados dos hormônios (estrogênio e progesterona), bem como das células vizinhas e componentes do seu microambiente (fatores de crescimento) (HONDERMARCK, 2003). O repetido ciclo de mudanças, com proliferação e involução das estruturas mamárias devido à menstruação e gestação/ lactação, que ocorre entre os 15 e 50 anos de idade, gera muitas oportunidades para que ocorram pequenas disfunções (HUGHES *et al.*, 2000; COURTILLOT *et al.*, 2005).

O risco de disfunções ainda é aumentado pela involução concomitante da mama que ocorre por 20 anos, entre os 35 e 55 anos de idade. Essa involução afeta os lóbulos e é altamente dependente da relação entre o epitélio e o estroma especializado do lóbulo (HUGHES, 2000). Durante o processo de involução lobular, os tecidos conectivos intralobulares com resposta a hormônios são perdidos e substituídos por um tecido intralobular fibroso. Eventualmente, ao longo da menopausa, a involução ocorre extensivamente restando apenas alguns ductos e nenhum ou poucos lóbulos. Caso o estroma desapareça precocemente, o ácino epitelial pode permanecer e formar microcistos, que podem se desenvolver em macrocistos (COURTILLOT, 2005).

O termo “câncer de mama” engloba numerosos tipos de tumores, que são classificados de acordo com sua origem e suas características histológicas. Há duas classes principais: carcinomas *in situ* e carcinomas invasivos, o primeiro tipo é caracterizado por uma proliferação de células epiteliais malignas confinadas aos ductos (carcinoma ductal *in situ* – DCIS) ou lóbulos mamários (carcinoma lobular *in situ* – LCIS), sem evidência microscópica de invasão da membrana basal do estroma vizinho (HONDERMARCK, 2003).

Em contraste, nos carcinomas invasivos, a membrana basal é parcialmente ou totalmente destruída e as células tumorais invadem progressivamente os tecidos circundantes, apresenta o pior prognóstico e cerca de 70% formam metástases nos linfonodos axilares. O grupo de carcinomas invasivos inclui mais de 10 tipos diferentes. O carcinoma ductal invasivo (65 – 80% de todos os cânceres de mama) e o carcinoma lobular invasivo (5 – 15% de todos os casos) constituem os dois principais tipos, enquanto outras formas como mucinoso, medular, tubular, e carcinoma apócrino são menos frequentes (0,1 – 4%) (HONDERMARCK, 2003).

A prática de se dividir os casos de câncer em grupos, de acordo com os chamados estádios, surgiu do fato de que as taxas de sobrevida eram maiores para os casos nos quais a doença era localizada do que para aqueles nos quais a doença tinha se estendido além do órgão de origem. O sistema de classificação de tumores malignos (TNM) trabalha prioritariamente com a classificação por extensão anatômica da doença, determinada clínica e histopatologicamente quando possível. Este sistema tem por base a avaliação de três componentes: T – extensão do tumor primário, N – ausência ou presença e a extensão de metástases em linfonodos regionais e M – ausência ou presença de metástases à distância (TNM: CLASSIFICAÇÃO DE TUMORES MALIGNOS, 2004).

Histologicamente os carcinomas mamários são divididos com base na avaliação da formação do túbulo/ glândula, pleomorfismo nuclear e contagens mitóticas, cada um destes é pontuado numa escala de 1 a 3. As notas dos três componentes são somadas e adequadas segundo as categorias: grau I – bem diferenciado (bom prognóstico); grau II – moderadamente diferenciado e grau III – indiferenciado (mau prognóstico). Tanto o sistema TNM quanto o grau histológico são significativamente associados com a sobrevida no câncer de mama invasivo e são reconhecidos como importantes fatores prognósticos (BATEMAN, 2007; OLDENBURG *et al.*, 2007).

2.1.1 Fatores de Risco

São diversos os fatores de risco que podem contribuir para o desenvolvimento do câncer de mama, como:

- Constituição Genética: a história familiar se constitui em um fator importante, principalmente se o câncer ocorreu na mãe ou em irmã e se desenvolveu antes da

menopausa. Cerca de 13% de todos os pacientes tem um parente de primeiro grau com câncer de mama (COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER FAMILIAL, 2001; OLDENBURG *et al.*, 2007). Mulheres que apresentam mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2* têm 85% de chance de desenvolver câncer de mama antes dos 70 anos de idade (INCA/MS, 2010).

- Fatores Demográficos: o gênero (sexo feminino) constitui-se num fator de risco isolado. Comparando-se as taxas de incidência de câncer de mama entre mulheres e homens, este grupo apresenta valores muito menores; aproximadamente um em cada 150 casos ocorrem em homens. A idade aparece como um dos principais fatores de risco para os cânceres em geral, visto que estes ocorrem pelo acúmulo de mutações em determinadas células ou tecidos. A incidência de câncer de mama é menor que 0,0001 em mulheres com 25 anos ou menos, e pode aumentar em até 10 vezes depois dos 40 anos de idade. Outros fatores considerados são a origem étnica, a região geográfica e o baixo nível sócio-econômico (OLDENBURG *et al.*, 2007).

- Fatores Endógenos: a menopausa tardia (após os 50 anos de idade), a ocorrência da primeira gravidez após os 30 anos e a nuliparidade (não ter tido filhos) representam fatores de risco para o câncer de mama (INCA/MS, 2010). A menarca precoce (antes dos 12 anos de idade) isoladamente confere um aumento no risco de 10 – 20% (OLDENBURG *et al.*, 2007). O risco é elevado devido à exposição a altas taxas de estrogênio endógeno.

- Fatores Exógenos: o uso de contraceptivos orais e a terapia de reposição hormonal continuam sendo alvo de controvérsia. Aparentemente, certos subgrupos de mulheres, particularmente as que usam pílulas com dosagens elevadas de estrogênios e/ ou progesterona por longo período de tempo, têm um maior risco (PARKIN *et al.*, 2001). Uma revisão (COLLINS *et al.*, 2005) sobre o risco de câncer de mama associado com o tratamento de reposição hormonal na menopausa relatou que o mesmo é maior em mulheres em tratamento do que em mulheres não tratadas ou que interromperam o tratamento. Para essas últimas, o risco diminui logo após o encerramento do tratamento atingindo os parâmetros normais em cinco anos. Além disso, os autores constataram que o risco de desenvolver câncer de mama é maior em mulheres que utilizam o estrogênio juntamente com a progesterona no tratamento de reposição hormonal, do que em mulheres que utilizam somente estrogênio. Outro elemento de risco é a exposição à radiação ionizante,

especialmente antes dos 35 anos de idade, este risco é dependente da dose de radiação e diminui gradualmente ao longo do tempo (OLDENBURG *et al.*, 2007).

- **Características Físicas:** a obesidade pós-menopausa em mulheres aumenta o risco de câncer de mama, sendo que para cada 5 kg de ganho de peso, o risco aumenta cerca de 8%. A densidade da mama na mamografia também é outro fator importante, mulheres com mais de 75% de aumento na densidade da mama, tem cinco vezes mais chances de desenvolver o tumor do que mulheres com menos de 5% de aumento de densidade mamária. Outros fatores como, elevada densidade óssea, altos níveis do fator de crescimento semelhante à insulina (*IGF-I*) e baixa atividade física (sedentarismo) também influenciam o desenvolvimento do câncer de mama (OLDENBURG *et al.*, 2007).

- **Fatores de Dieta:** a ingestão regular de álcool, mesmo que em quantidade moderada, é identificada como fator de risco para o câncer de mama, além de baixa ingestão de folato, e uma dieta rica em gorduras. Estudos epidemiológicos sugerem que dietas ricas em fitoestrógenos (especialmente os produtos derivados da soja e de grãos não refinados) podem estar associadas com um menor risco de desenvolver o câncer de mama. Os fitoestrógenos englobam diversos grupos de estrógenos não-esteróides que são amplamente distribuídos dentro do reino vegetal, incluindo isoflavonas e lignanos (OLDENBURG *et al.*, 2007).

2.2 ERA PÓS-GENÔMICA: PROTEÔMICA

A Biologia vem passando por um período de grande transformação, sobretudo devido ao rápido avanço da biologia molecular aliada aos projetos de seqüenciamento em larga escala, que vêm gerando uma grande quantidade de informações sobre a organização do material genético de vários organismos. Entretanto, o seqüenciamento de genes não gera informações sobre a regulação da expressão gênica, modificações pós-traducionais e distribuição espaço-temporal em células e tecidos das proteínas presentes nestes complexos sistemas de interação. O genoma de um organismo é único, praticamente estático e constante em todas as células somáticas ou sob condições ambientais diferentes; por outro lado o perfil protéico é extremamente variável em distintas situações ou diferentes tipos celulares

em um mesmo organismo, constituindo-se em um fluxo dinâmico respondendo a estímulos internos e externos (WILKINS *et al.*, 1996).

O termo proteoma foi utilizado pela primeira vez em 1994 no congresso de eletroforese bidimensional em Siena/ Itália; a palavra indica as *PROTEÍNAS* que são expressas por um genOMA ou tecido (WILKINS *et al.*, 1997). Segundo SNUSTAD e SIMMONS (2008), proteoma, com transcriptoma, com interactoma, entre outros, fazem parte de um grupo denominado de Genômica Funcional (que tem como objeto de estudo o funcionamento do genoma), que por sua vez é uma subdivisão da Genômica.

O proteoma reflete o estado atual de funcionamento do sistema em condições fisiológicas específicas, ou seja, a expressão funcional do genoma. Esta característica faz com que o estudo do proteoma se torne um grande desafio, pois a expressão gênica de uma célula é bastante dinâmica, dependendo do estado de desenvolvimento, da presença de ativadores ou inibidores e também das condições do meio ambiente. Apesar disso, a proteômica é o método mais apropriado para se entender o funcionamento dos genes, porque analisa o produto final do genoma (PANDEY e MANN, 2000), possibilitando identificar determinada proteína e conseqüentemente o gene que a está codificando.

O proteoma de uma célula é muito dinâmico. O conjunto de proteínas está mudando continuamente no interior de cada célula, e é completamente dependente do microambiente (GEHO *et al.*, 2004).

No estudo do câncer, e em muitos outros, verifica-se que um dos resultados do seqüenciamento do genoma humano, foi o desenvolvimento da proteômica, transferindo da genômica as metas e expectativas em termos de aplicações biomédicas. Na era pós-genômica, a proteômica se caracteriza como um dos principais e fundamentais métodos para identificar novas proteínas, modificações pós-traducionais, ou redes de proteínas que podem ser utilizadas para uma melhor compreensão, detecção e tratamento do câncer (HONDERMARCK *et al.*, 2008).

O dogma central da biologia molecular é baseado na transcrição do DNA genômico em mRNA, e a tradução deste em proteínas, a unidade funcional dos genes (THIEFFRY e SARKAR, 1998). As análises de DNA e RNA através de técnicas como microarranjos, hibridização genômica comparativa (CGH), perda de heterozigose (LOH) e polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) são importantes na identificação de anormalidades genéticas e na descoberta de disfunções

moleculares existentes nas células tumorais, entretanto não são capazes de analisar os eventos que ocorrem a nível protéico. É importante a compreensão dos perfis de expressão protéica a partir de tecnologias proteômicas, especialmente porque o câncer é cada vez mais reconhecido como uma doença proteômica (SOMIARI *et al.*, 2005).

A proteômica vem sendo cada vez mais utilizada para decifrar os mecanismos moleculares no câncer de mama, como crescimento celular e o processo metastático. Os objetivos são duplos: entender os mecanismos básicos de iniciação e progressão do câncer e identificar novos alvos terapêuticos. No câncer de mama, algumas informações sobre a atividade de oncogenes e genes supressores de tumor vêm sendo obtidas através da proteômica, como, o mecanismo de ação dos genes *BRCA1* e *BRCA2* (HONDERMARCK *et al.*, 2008).

Muitos trabalhos na área de proteômica envolvem o receptor de membrana tirosina-quinase *ERBB2/HER-2*, que é super expresso em cerca de um quarto dos casos de câncer de mama. Modificações associadas à ativação do *ERBB2* foram relacionadas especialmente a nível do fosfoproteoma (BOSE *et al.*, 2006; HONDERMARCK *et al.*, 2008).

Muitos fatores de crescimento iniciam a sinalização intracelular através de receptores de membrana tirosina-quinases, que por sua vez induzem a interação de proteínas intracelulares e cascatas de fosforilação envolvendo uma variedade de proteínas de sinalização como as *MAP*-quinases (*mitogen activated protein*). Estas cascatas de fosforilação protéica induzem mudanças na expressão de genes, com conseqüente modificação na síntese de proteínas, resultando na proliferação, diferenciação ou migração celular (HONDERMARCK *et al.*, 2008).

No câncer de mama diversos fatores de crescimento (epidermal – *EGF*, de fibroblasto - *FGFs*) vêm sendo investigados pela técnica de proteômica, por estarem envolvidos no desenvolvimento e crescimento de células tumorais. Para o *EGF*, que é um forte agente mitógeno das células do câncer de mama, já foi demonstrado que a superexpressão do seu receptor (*ERBB1* ou *EGFR*) aumenta a expressão do marcador epitelial citoqueratina 19, toda esta via relacionada com um pior prognóstico da doença (HONDERMARCK *et al.*, 2008).

Atualmente, as análises proteômicas englobam uma série de diferentes metodologias. Após a extração das proteínas a partir de células em cultura de tecido ou de biópsias, a utilização de métodos de separação (como a eletroforese

bidimensional) e a análise de bioinformática permitem a detecção de proteínas expressas diferencialmente. A identificação destas proteínas e a determinação de suas modificações pós-traducionais são realizadas, principalmente, utilizando a espectrometria de massa e a pesquisa em banco de dados (HONDERMARCK *et al.*, 2002). Outro aspecto metodológico importante para o atual sucesso da proteômica tem sido a bioinformática, com o desenvolvimento de programas computacionais capazes de analisar, armazenar e correlacionar grande quantidade de dados, além da disponibilização e da troca das informações através da *Internet*. Um dos pontos-chaves de tal sucesso se deve à possibilidade de realizar uma correlação dos dados obtidos por técnicas proteômicas com outros dados genômicos, analisados de forma integrada e quase instantânea através da rede mundial de computadores (BISCH, 2004).

Diversas estratégias e metodologias são utilizadas na análise proteômica comparativa e na identificação de marcadores específicos para o câncer (SOMIARI *et al.*, 2005). Atualmente as principais técnicas utilizadas na proteômica são a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) e a espectrometria de massa.

2.2.1 Eletroforese Bidimensional em Gel de Poliacrilamida (2D-PAGE):

Os métodos de separação de proteínas em gel 2D se desenvolveram rapidamente a partir da metade da década de 1970 com a introdução do gel bidimensional por Klose (1975), O'Farrel (1975) e Scheele (1975), que trabalharam respectivamente com o mapeamento de proteínas em camundongo, em *Escherichia coli*, e uma espécie de roedor (GRAVES e HAYSTEAD, 2002). Mas só passou a ter uma maior empregabilidade na década de 1990, após uma revolução da química de proteínas, e com o surgimento da proteômica (WILKINS *et al.*, 1997). Inicialmente restrita ao estudo das proteínas mais abundantes, atualmente esta técnica é capaz de separar centenas de proteínas em um único gel (BISCH, 2004).

A eletroforese bidimensional é um método eficaz e amplamente utilizado para a análise de misturas complexas de proteínas de células, tecidos e outras fontes biológicas (FEY e LARSEN, 2001). Entre todos os métodos proteômicos disponíveis, o 2D-PAGE é o mais citado na literatura relacionado com o câncer de mama e também o mais utilizado para a caracterização proteômica deste tipo de doença,

provavelmente por oferecer a melhor resolução e ter uma alta reprodutibilidade (SOMIARI *et al.*, 2005).

Na eletroforese bidimensional, as proteínas são separadas em duas etapas de acordo com duas propriedades físico-químicas independentes: a primeira etapa ou primeira dimensão é denominada de Focalização Isoelétrica (IEF), na qual as proteínas são separadas de acordo com os seus diferentes pontos isoelétricos (pI). O pI de uma proteína corresponde ao valor de pH no qual a somatória de todas as suas cargas parciais é igual a zero. Uma vez submetidas a um campo elétrico, as proteínas migrarão até encontrar uma faixa de pH referente ao seu pI e neste ponto ficarão com carga total neutra, interrompendo a migração no gel (BERKELMAN e STENSTED, 1998).

Na segunda etapa ou segunda dimensão, as proteínas são separadas de acordo com as suas massas moleculares por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE). Desta forma, é possível obter um mapa bidimensional das proteínas produzidas por uma célula ou tecido, além de separar e identificar centenas ou milhares de proteínas. É possível obter informações sobre o pI, massa molecular e abundância relativa, assim como modificações pós-traducionais e isoformas, já que, geralmente, elas provocam mobilidade eletroforética alterada (GORG *et al.*, 2000).

Entretanto o método de eletroforese 2D possui algumas limitações, determinadas proteínas com massas moleculares muito altas ou muito baixas não são bem separadas nas eletroforeses bidimensionais. As proteínas altamente hidrofóbicas e alcalinas também necessitam de métodos específicos de preparação das amostras (HERBERT, 1999; GORG *et al.*, 2000). Além disso, a faixa analítica da técnica é de poucas ordens de magnitude, o que dificulta a detecção de proteínas pouco expressas (DAVIS e HANASH, 2006).

Sua vantagem em relação a outros métodos é a capacidade de separar com alta resolução um grande número de proteínas de uma amostra complexa e a possibilidade de se fazer análises de expressão gênica por meio da comparação dos padrões protéicos, características que asseguram que a eletroforese bidimensional continuará sendo fundamental nos estudos proteômicos (BISCH, 2004; ROCHA *et al.*, 2005).

2.2.2 Espectrometria de Massa:

A análise por espectrometria de massa (*MS*) possui grande importância como método de identificação protéica. Este interesse é enfatizado pela sua dupla aplicabilidade, tanto para a descoberta de biomarcadores quanto para o desenvolvimento de diagnósticos com base no padrão proteômico do tecido estudado (CALVO *et al.*, 2005).

Um dos primeiros estudos a utilizar a *MS* na análise de tecido, demonstrou que os padrões de espectros da *MS* de biópsias poderiam ser utilizados para distinguir células benignas ou pré-malignas das de câncer invasivo (CALVO *et al.*, 2005). Para o câncer de mama, a *MS* tem o potencial de melhorar o diagnóstico da biópsia, definir melhor as margens do tumor, e auxiliar na decisão do tratamento (LARONGA e DRAKE, 2007).

A espectrometria de massa baseia-se na determinação da relação massa/carga de íons em fase gasosa. As aplicações deste método no estudo das biomoléculas se iniciaram no final da década de 80, com o desenvolvimento de duas novas técnicas que permitem a ionização destas macromoléculas de um estado sólido para um estado gasoso (desorção), etapa imprescindível para uma medida precisa da massa molecular. As duas técnicas, desorção por *laser* ionizante assistida por uma matriz (MALDI) e ionização por eletrodispersão (ESI), tornaram-se amplamente utilizadas na identificação e seqüenciamento dos polipeptídeos (BISCH, 2004). Com o avanço da técnica, foram possíveis várias aplicações da espectrometria de massa no estudo de proteínas como a determinação precisa da massa molecular, quantificação de cisteínas, localização de pontes dissulfeto, determinação de modificações pós-traducionais como glicosilações e fosforilações, determinação da seqüência de aminoácidos e principalmente a identificação de proteínas (LARSEN e ROEPSTORFF, 2000).

A combinação da técnica de desorção por *laser* (MALDI) de moléculas contidas em uma matriz sólida com a medida do tempo de voo (*TOF*) em alto vácuo, tem sido utilizada como método preferencial nos estudos proteômicos. O primeiro passo para a identificação das proteínas obtidas em um gel é realizado através da digestão, por enzimas proteolíticas, das bandas protéicas do gel.

Dentre as enzimas proteolíticas, uma das mais utilizadas é a tripsina, que tem como característica a estabilidade e um sítio de clivagem específico após resíduos de lisina e arginina na região C-terminal (SALZANO e CRESCENZI, 2005).

Após a digestão pela tripsina, os peptídeos de interesse são cristalizados em uma matriz, a qual possui um pico de absorção num comprimento de onda específico (337nm), esta matriz auxilia na ionização e protege a amostra de peptídeos da decomposição que ocorreria por excesso de energia.

A partir da energia liberada de um feixe de *laser*, a matriz será excitada e a proteína ionizada (MARTIN e NELSON, 2001). Posteriormente será realizada a identificação do espectro de massas dos peptídeos resultantes da digestão (PMF – *peptide mass fingerprinting*). A comparação deste espectro com os bancos de dados pode identificar a proteína (BISCH, 2004).

Outro aspecto importante na análise de proteínas são as modificações pós-traducionais (MPT), que são alterações covalentes que regulam as funções da proteína, determinando seu estado de atividade, localização celular e interações dinâmicas com outras proteínas. Mais de 400 tipos diferentes de modificações pós-traducionais são conhecidas (FARLEY e LINK, 2009). Apesar da importância das MPT para compreender uma grande quantidade de processos celulares, sua análise abrangente apresenta algumas limitações biológicas e analíticas. MPT são muitas vezes transitórias e ocorrem “*in vivo*” apenas em uma pequena fração de proteínas (menos de 1%) (SALZANO e CRESCENZI, 2005).

As mais importantes e melhor estudadas MPT incluem fosforilação reversível, ocorrendo em resíduos de treonina, serina e tirosina; e glicosilação, que consiste na ligação covalente de oligossacarídeos aos aminoácidos lisina e aspargina. Outras modificações comuns são: acetilação, metilação, ligação de lipídios, sulfatação da tirosina, ubiquitinação e formação de pontes dissulfeto (SALZANO e CRESCENZI, 2005).

2.2.3 Aplicações da Proteômica:

A proteômica tem como um de seus objetivos a caracterização das vias protéicas e os eventos de sinalização que são relevantes em diversas doenças. É amplamente reconhecido que os estudos proteômicos desempenham um importante papel em oferecer dados que auxiliam a compreensão dos mecanismos de

progressão do câncer, bem como na identificação e validação de novos alvos terapêuticos (SOMIARI *et al.*, 2005).

As aplicações da proteômica podem ser divididas em quatro categorias gerais: (1) a pesquisa de proteínas totais (entre as aplicações da proteômica é a mais desafiadora e a que exige mais recursos) permite realizar uma análise direta e identificar as proteínas presentes no câncer de mama, em vez de deduzir a composição do proteoma pela transcriptômica; (2) o perfil de expressão protéica, no qual geralmente é realizada uma análise diferencial, por exemplo, comparando as proteínas expressas no tecido normal de mama com aquelas expressas numa biópsia de tumor mamário; (3) o mapeamento de um conjunto de proteínas (determinando a condição e a forma na qual as proteínas interagem umas com outras nos seus ambientes naturais) e (4) a caracterização das modificações pós-traducionais (determinação como e onde as proteínas são modificadas) (LIEBLER, 2002; SOMIARI *et al.*, 2005).

Uma das aplicações da proteômica é a busca por potenciais biomarcadores. Estes geralmente são classificados em três tipos: diagnóstico, auxiliando na correta definição da doença; prognóstico, provendo informações sobre o curso clínico da doença e preditivo, na escolha da melhor forma de tratamento (AZAD *et al.*, 2006).

Mutações gênicas, alterações na transcrição e tradução e alterações nos produtos protéicos podem potencialmente ser utilizadas como biomarcadores específicos de doenças (WULFKUHLE *et al.*, 2003).

Diversas classes de moléculas são comumente relatadas como possíveis biomarcadores para o câncer de mama: (1) receptores hormonais, envolvidos na regulação do ciclo celular, modificação da matriz extracelular, proliferação celular, supressão tumoral; (2) oncogenes ou proto-oncogenes (SOMIARI *et al.*, 2003). Entre os marcadores relacionados com o câncer de mama, os receptores hormonais, particularmente, de estrogênio (RE) e de progesterona (RP), são os mais utilizados nas pesquisas.

Biomarcadores de risco podem auxiliar a identificar indivíduos que possuem um risco maior de desenvolver câncer. Estes marcadores são baseados principalmente nas susceptibilidades adquiridas somaticamente ou herdadas, na forma de genes alterados como *MSH2* e *MLH* no câncer colorretal hereditário não-poliposo, *PRB* no retinoblastoma hereditário, e *BRCA1* e *BRCA2* que predispõe ao câncer de mama. Nestes casos, há uma predisposição familiar inerente ao

desenvolvimento de alguns tipos de câncer, embora muitos indivíduos que herdam estes genes alterados podem não desenvolver a doença. Isto sugere o envolvimento de outros fatores, tais como o ambiente, que podem interagir com genes específicos para iniciar o câncer. No entanto, marcadores de risco são importantes no monitoramento de indivíduos, permitindo um diagnóstico precoce para aqueles que desenvolverem a doença (SRINIVAS *et al.*, 2001).

O perfil proteômico é útil para a descoberta de biomarcadores, contudo, tem limitações intrínsecas. Primeiro, devido à complexidade da amostra e a dificuldade de encontrar marcadores entre centenas a milhares de outras proteínas da amostra biológica. Segundo, não fornece (ou fornece apenas limitadamente) informação sobre proteínas específicas, como o papel biológico da proteína, exceto em um subproteoma em particular. Terceiro, a proteômica em geral é um processo caro que requer bastante tempo e não é compatível, para a análise, com uma grande quantidade de amostras clínicas (GUO *et al.*, 2007).

Antes do uso clínico dos biomarcadores, é necessário que eles tenham uma eficácia comprovada e que não sejam apenas resultados de uma resposta adaptativa do organismo (SRINIVAS *et al.*, 2001). Há centenas de candidatos a biomarcadores, mas para a comprovação de sua especificidade e relevância clínica, estes devem ser validados (etapa mais difícil). Para o câncer de mama ainda não foi obtido nenhum biomarcador validado (DAVIS e HANASH, 2006).

Uma condição importante para a aplicação clínica da proteômica será, certamente a integração com outras metodologias utilizadas no estudo do câncer, como a genômica, transcriptômica, interactoma, entre outras. Todas estas fornecendo uma grande quantidade de dados que auxiliem no diagnóstico precoce e tratamento da doença.

3. JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é uma das doenças que mais acometem mulheres em todo o mundo, com grande morbidade e mortalidade. Apesar dos avanços significativos que vêm sendo realizados na detecção e tratamento, a detecção tardia ainda se constitui num grave problema e a pesquisa de biomarcadores moleculares é relevante em todos os âmbitos da pesquisa científica.

Com a finalização do Projeto Genoma Humano em 2003, foram intensificadas as pesquisas para a compreensão da função gênica como um todo, incluindo o estudo em larga escala das proteínas expressas. Com isso a proteômica se tornou importantíssima como um dos meios mais eficientes para o estudo funcional dos genes.

Pesquisas sobre o proteoma de carcinomas de mama são uma fonte de descoberta de potenciais biomarcadores que poderão ser utilizados para auxiliar a detecção precoce, o diagnóstico da doença, o prognóstico e predição de resposta a terapia, além da identificação de potenciais alvos para novos tratamentos.

4. OBJETIVOS

O objetivo geral é analisar amostras de carcinomas primários de mama pelo método proteômico.

Objetivos específicos:

- Implantar a metodologia para análise proteômica em genética humana no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética da UFPR.
- Detectar e identificar as proteínas mais frequentes entre todas as amostras de tecido mamário tumoral;
- Criar um banco de dados com as informações obtidas a partir das identificações protéicas para futura comparação com dados de tecido mamário normal.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Este estudo foi realizado com amostras de tecido mamário tumoral em diferentes estágios clínicos, coletadas no momento da cirurgia, de seis pacientes dos Hospitais Nossa Senhora das Graças e das Clínicas de Curitiba, Paraná, nos anos de 2008 e 2009. A média da idade das pacientes foi $62,67 \pm 8,14$ anos, conforme QUADRO 01.

O projeto deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do HNSG, Curitiba - PR. Processo nº 25000.007020/2003-93; registro no CONEP: 7220 e parecer nº 251/2003, de 20/02/2003.

AMOSTRAS DE TECIDO TUMORAL						
Cod.	Idade	Tipo Histológico	Grau	Tamanho	RE	RP
CP 622	71 anos	Carcinoma Ductal Invasor	I	30 mm	Positivo	Positivo
CP 627	61 anos	Carcinoma Ductal Invasor	III	20 mm	Positivo	Positivo
CP 630	49 anos	Carcinoma Ductal Invasor	I	15 mm	-	-
CP 633	71 anos	Carcinoma Ductal Invasor	II	40 mm	Positivo	Positivo
CP 644	61 anos	Carcinoma Ductal Invasor	III	35 mm	Negativo	Negativo
CP 645	63 anos	Carcinoma Ductal Invasor	II	58 mm	Positivo	Positivo

QUADRO 01 – CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

FONTE: O autor (2010)

NOTA: **Cod** – código das amostras, **RE** – receptor de estrogênio, **RP** – receptor de progesterona.

5.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

5.2.1 Coleta do material biológico e armazenamento das amostras

As coletas de amostras dos tecidos mamários tumorais foram realizadas através de procedimento cirúrgico, e enviadas em tubos *falcon* (50 ml) rotulados para o Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética da UFPR e foram mantidas a 4°C, por no máximo um dia, até o momento do processamento.

As amostras, logo após a ressecção cirúrgica, foram processadas para remoção de tecido normal que eventualmente permaneceu ao redor do tumor, vasos sanguíneos e gordura. Os tumores foram fragmentados com tesouras e pinças, e transferidos para tubos eppendorf de 2 ml, sendo estocados a 80°C negativos para posterior extração das proteínas. Todo o procedimento foi realizado com material estéril, no fluxo laminar e com luvas sem talco.

5.2.2 Extração de proteínas

Ao contrário dos estudos envolvendo o DNA, as abordagens da Proteômica concentram-se exclusivamente nas proteínas e na expressão destas em um determinado tecido, órgão ou organismo; para tanto na preparação das amostras são utilizadas substâncias que eliminam outros elementos celulares, como: DNA, RNA, membrana celular, etc. As amostras estocadas a 80°C negativos foram descongeladas e fragmentadas novamente até obter a quantidade necessária para o experimento (0,4g de amostra) e foram colocadas em tubos eppendorf (2 ml), sendo que em cada tubo foi adicionado 1ml de Tampão de Lise (7M Uréia, 2M Tiuréia, 40mM Tris, 40mM DTT, 4% CHAPS e 0,2% inibidor de protease PMSF), adaptado ao protocolo fornecido pela GE Healthcare (*2-D Electrophoresis Principles and Methods*, 2005). A desagregação e a homogeneização do tecido foram realizadas no próprio tubo com um homogeneizador elétrico. Durante todo o processo as amostras ficaram em banho de gelo para preservar a integridade do material. Após este procedimento as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 5 minutos a 4°C, resultando em um precipitado, o qual foi descartado (pois continha as impurezas presentes na amostra) e em um sobrenadante, que contém as proteínas extraídas e solubilizadas do tecido tumoral.

5.2.3 Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas nas amostras foi mensurada a partir da técnica de Bradford (BRADFORD, 1976), que se baseia na ligação do azul brilhante de coomassie com a proteína. Esta interação estabiliza a forma aniônica do corante, causando uma visível mudança de coloração inicialmente castanho para tons de azul. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas, utilizando o

comprimento de onda de 595nm. A comparação dos resultados com uma curva padrão, com valores de concentrações conhecidos, permitiu a determinação da concentração das amostras. A albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumine*, BSA) foi utilizada como padrão.

5.3 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2D-PAGE)

5.3.1 Reidratação das tiras (*strips*) e Focalização Isoelétrica (IEF)

Foram utilizadas tiras IPG (*immobilized pH gel*) ou *strips* na faixa de pH de 4 a 7 (130x3x0,5 mm; GE Healthcare). Primeiramente foi realizada a reidratação das *strips* juntamente com a amostra para depois ser realizada a focalização isoelétrica (primeira dimensão). Para a reidratação das tiras foi utilizado um suporte de acrílico com 12 canaletas (*Immobiline DryStrip Reswelling Tray*/ GE Healthcare), as amostras foram aplicadas nas tiras IPG em um Tampão de Reidratação (7M Uréia, 2M Tiuréia, 2% CHAPS, sendo adicionado 50mM DTT e 0,5% IPG *buffer* apenas no momento do uso) em uma das canaletas do suporte. Ao tampão foi misturado 1000 µg de proteína total da amostra atingindo um volume de 250 µl. As tiras foram colocadas com a superfície do gel virada para baixo, e em seguida cobertas com 2 ml de óleo mineral (*DryStrip Cover Fluid*/ GE Healthcare) evitando que a uréia se cristalice e que as tiras sequem. O período de reidratação para todas as tiras foi de 16 horas, mantido em temperatura ambiente.

Logo após a reidratação foi realizada a segunda etapa que é a focalização isoelétrica, na qual as proteínas foram separadas em função dos seus pontos isoelétricos (pI). Foi utilizada uma placa de cerâmica também com 12 canaletas (*Manifold*/ GE Healthcare). As tiras foram transferidas do suporte de acrílico para a placa de cerâmica, na qual é colocado óleo mineral em todas as canaletas (mesmo aquelas que não contêm as tiras), para que as *strips* e o equipamento não sejam danificados. Em seguida, foram colocados dois eletrodos, ambos em contato com as tiras, um na parte superior e o outro na inferior, por onde a corrente elétrica deslocasse. A Focalização Isoelétrica foi realizada no sistema de eletroforese *Ettan IPGphor II* (GE Healthcare), com o programa específico para a tira de 13 cm, pH 4 a 7

(QUADRO 02). Após a IEF as tiras foram imediatamente armazenadas a 80°C negativos até a realização da segunda dimensão.

Fase	Voltagem (V)	Tempo (h; min)	kVh
1	500	1:00	0,5
2	1000	1:00	0,8
3	8000	2:30	11,3
4	8000	0:30	4,1
Total		5:00	16,7

QUADRO 02 – PROGRAMA PARA O *Ettan IPGphor II*

FONTE: O autor (2010)

NOTA: tira IPG de 13 cm, pH 4 a 7; **h** – hora, **min** – minutos, **kVh** – kilovolts/ hora.

5.3.2 Equilíbrio das tiras

Em seguida a focalização isoeletrica as tiras foram equilibradas por duas vezes de 15 minutos cada em temperatura ambiente antes de correr a segunda dimensão. A primeira foi realizada com 5 ml de Tampão de Equilíbrio (50mM Tris-HCl – pH 8,8; 6M Uréia; 30% (p/v) Glicerol, 2% (p/v) SDS e traços de azul de bromofenol) e 50mM DTT (agente redutor); na segunda repetição as tiras foram equilibradas em 5 ml de tampão de equilíbrio contendo 4,5% de iodoacetamida, este reagente alquila grupos tióis nas proteínas, prevenindo a sua reoxidação durante a eletroforese, o que poderia resultar em traços e artefatos no gel. O segundo equilíbrio com iodoacetamida minimiza reações indesejáveis dos resíduos de cisteína.

5.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

Após o equilíbrio as tiras foram submersas por 5 segundos (somente para retirar o excesso de tampão de equilíbrio) em tampão de corrida (25mM Tris-base, 192mM Glicina e 0,1% SDS) e em seguida posicionadas horizontalmente sobre o gel SDS-PAGE 10% com dimensões de 18 cm x 16 cm (com a sua superfície de plástico em contato com a placa de vidro). Marcadores de massa molecular (LMW) conhecida entre 14 e 97kDa (GE Healthcare) foram aplicados em papel filtro que foi posicionado sobre o gel à esquerda da tira. As tiras e o LMW foram selados com agarose 1% em tampão de corrida com traços de azul de bromofenol.

A segunda dimensão foi realizada em tampão de corrida sob temperatura de 11°C, mantida por refrigeração com circulador termostático *Multitemp II*, utilizando o sistema eletroforético *Hoefler SE 600 Ruby* (GE Healthcare). Para que a passagem das proteínas da tira para o gel SDS-PAGE ocorresse de maneira suave e homogênea, a eletroforese foi desenvolvida a 15mA/ gel nos 30 minutos iniciais. O restante da corrida foi realizada a 30mA/ gel, sendo interrompida quando a frente de migração estava a aproximadamente 1cm do limite inferior do gel. A duração total foi de aproximadamente 4 horas e 30 minutos. Todas as etapas e soluções utilizadas no 2D-PAGE foram adaptadas e desenvolvidas a partir do protocolo fornecido pelo fabricante do aparelho (*2-D Electrophoresis Principles and Methods*, 2005).

5.4 COLORAÇÃO, DIGITALIZAÇÃO E ANÁLISE COMPUTACIONAL

Logo após a segunda dimensão ocorreu a fixação das proteínas ao gel, durante uma hora, em solução contendo 1,3% (w/v) ácido orto-fosfórico 85% e 20% (v/v) metanol. Foi utilizada a coloração com coomassie coloidal adaptada de WESTERMEIER, 2006. Os géis ficaram submersos em 300 ml de solução corante (1,5% ácido orto-fosfórico 85%, 7,7% sulfato de amônio e 0,01% coomassie G-250) sob leve agitação por um período de 16 a 20 horas. Para permanecerem apenas as marcações das bandas os géis foram descorados em água destilada. O armazenamento foi realizado a 4°C em solução 1% ácido acético.

Depois de corado o gel foi digitalizado pelo equipamento *ImageScanner™ II* (GE Healthcare). A análise das imagens foi realizada pelo programa *ImageMaster™ 2D Platinum v6.0* (GE Healthcare). Os parâmetros para a detecção das bandas pelo programa foram os seguintes: *min area* – 5; *smooth* – 2 e *saliency* – 100. Este programa permite a contagem do número de bandas, a caracterização automática dos valores de pI e massa molecular (ROCHA *et al.*, 2005).

5.5 ESPECTROMETRIA DE MASSA

5.5.1 Preparo das amostras

As bandas de interesse foram retiradas manualmente do gel utilizando ponteiros novas estéreis tipo P1000 e colocadas para descorar por uma hora em tubos tipo eppendorf (0,5 ml) contendo 300 µl de solução 50% acetonitrila, 25mM bicarbonato de amônio. Este procedimento foi repetido quando necessário até a completa descoloração. Em seguida, foram submetidas a duas etapas de desidratação com 100 µl de acetonitrila 100% por 5 minutos cada. A acetonitrila foi desprezada e as bandas ficaram por uma hora secando a temperatura ambiente. As bandas descoradas e desidratadas foram armazenadas a 20°C negativos.

Para a digestão proteolítica *in gel*, as bandas selecionadas foram reidratadas em 15 µl de solução de tripsina (*Sequencing Grade Modified Trypsin*/ Promega) (15ng/µL em tampão contendo 40mM bicarbonato de amônio e 10% acetonitrila). A reidratação ocorreu durante 30 minutos em banho de gelo. Após esse período, a digestão foi realizada a 37°C por 16 a 20 horas. A solução contendo os peptídeos foi misturada na proporção 1:1 com solução 50% acetonitrila, 0,1% ácido trifluoracético saturada com matriz HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinamínico). O volume final de 2 µl foi aplicado em placa para MALDI (*scout MTP MALDI ion source 384 target – Bruker Daltonics*).

Primeiramente, das 80 bandas detectadas em todas as amostras, somente 37 (46%) haviam sido identificadas. Para o restante das bandas foi realizado novamente a identificação pelo método descrito acima, mas igualmente, não foi obtido resultado.

Com o objetivo de aumentar a porcentagem de identificação, foi realizada antes do MALDI-TOF a purificação dos peptídeos utilizando uma ponteira com uma coluna de fase reversa “*PerfectPure C-18 Tip*” (Eppendorf). O procedimento foi realizado de acordo com instruções do fabricante. A ponteira foi pré-umidificada duas vezes com 10 µl de 50% acetonitrila, 0,1% ácido trifluoracético e equilibrada duas vezes com 10 µl de 0,1% ácido trifluoracético. Em seguida, a amostra foi homogeneizada cerca de dez vezes, sempre tomando cuidado para que não ocorra a circulação de ar pela coluna de fase reversa. A amostra foi lavada cinco vezes

com 0,1% ácido trifluoracético para retirar contaminantes e os peptídeos foram eluídos da coluna em um tubo eppendorf (0,2 ml) com 2 µl de solução 50% acetonitrila, 0,1% ácido trifluoracético saturada com matriz HCCA, e depois foi realizada a aplicação na placa para o MALDI.

5.5.2 Obtenção e análise dos espectros de massa

As massas dos peptídeos tripticos foram determinadas utilizando um espectrômetro de massa MALDI-ToF/ToF/MS/MS modelo Autoflex II (Bruker Daltonics). O programa de computador utilizado foi o FlexControl 2.0 (Bruker Daltonics). Os espectros foram obtidos no modo refletor positivo, com uma voltagem de aceleração de 20kV, intervalo de 150 nano segundos entre o pulso de *laser* e aplicação da voltagem, e faixa de aquisição entre 800 – 3200Da. A calibração externa foi feita utilizando padrões de peptídeos de massa conhecida (angiotensina, ACTH e somatostatina) e como calibrante interno foram utilizados picos de autólise da tripsina (842,50Da e 2211,10Da) quando presentes. A análise e tratamento dos espectros foi feita utilizando o programa FlexAnalysis 2.0 (Bruker Daltonics). Este foi utilizado especialmente para retirar os espectros dos calibrantes e também de possíveis contaminantes.

5.5.3 Identificação das proteínas

As proteínas foram identificadas a partir do padrão de massas obtido (PMF – *peptide mass fingerprinting*), utilizando o programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>) associado ao uso do banco de dados SWISS-PROT. Os parâmetros de busca foram: enzima tripsina, um sítio de clivagem perdido, carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável (ANEXO 01); a tolerância máxima foi de 200ppm (partes por milhão).

Os critérios utilizados para a identificação protéica incluem:

- MASCOT score de probabilidade: é o valor atribuído à identificação pelo programa de busca (ANEXO 02). O valor mínimo a partir do qual a identificação deixa de ser considerada aleatória, varia de acordo com a taxonomia da amostra. Em buscas por proteínas humanas, utilizando o

banco de dados *Swiss-Prot* e o programa MASCOT, esse valor é 56. Quanto maior o *score*, maior a confiabilidade na identificação;

- Percentual da cobertura de seqüência: este valor indica o quanto da seqüência de aminoácidos da proteína sugerida foi coberto pelos peptídeos resultantes da digestão trípica da amostra (ANEXO 03). Foram considerados satisfatórios valores acima de 20%;
- Número de peptídeos sobrepostos: corresponde aos picos de massa obtidos com a *MS* e que foram pareados com as massas teóricas, provenientes da clivagem *in silico*. Estes valores são fornecidos pelo programa de busca MASCOT (ANEXO 03). Foi aceito o mínimo de 4 peptídeos sobrepostos;
- Dados de *MM* e *pI*: valores teóricos (calculados) condizentes com os obtidos no gel (observados).

Para considerar como positiva a identificação, a proteína tem que atender pelo menos dois dos critérios acima mencionados.

Os nomes e siglas utilizados para as proteínas foram os indicados no banco de dados *UniProtKB/ Swiss-Prot* (<http://www.expasy.ch/>). Os respectivos genes são representados pelas siglas e nomes oficiais de acordo com o NCBI – *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Os nomes e siglas das proteínas indicados pelo banco de dados e a tolerância (ppm) utilizada na identificação de cada uma das bandas estão representados no APÊNDICE.

6. RESULTADOS

6.1 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO TECIDO MAMÁRIO TUMORAL

O protocolo de extração protéica de tecido mamário tumoral foi implantado com sucesso no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, bem como a metodologia de eletroforese bidimensional foi executada com êxito no Departamento de Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) em colaboração com os Departamentos de Bioquímica e Patologia Básica do mesmo Setor.

A primeira etapa do trabalho consistiu na realização de uma eletroforese unidimensional (FIGURA 01), utilizada na separação de proteínas pela massa molecular. O grau de resolução do gel unidimensional é relativamente baixo e em uma única banda podem ser encontradas diversas proteínas (SOMIARI *et al.*, 2005), fornecendo apenas informações sobre a distribuição das bandas no mini-gel e a concentração de proteínas obtidas no extrato.

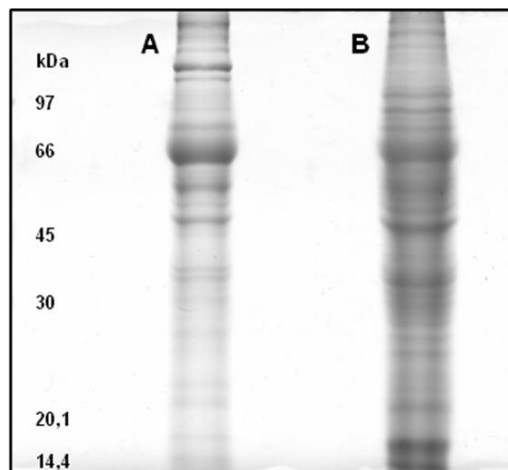


FIGURA 01 – GEL UNIDIMENSIONAL

FONTE: O autor (2010)

LEGENDA: **A** e **B** - amostras de carcinoma ductal invasor. O mini-gel foi corado utilizando coomassie coloidal.

Outra etapa foi definir qual faixa de pH das tiras que seria utilizada, para tanto foi obtido o extrato protéico de uma amostra de tecido tumoral e realizada a focalização isoeletrica utilizando tiras com faixas de pH diferentes, uma de pH 4 a 7 e outra de 3 a 10, e em seguida foi feita a eletroforese bidimensional (FIGURA 02).

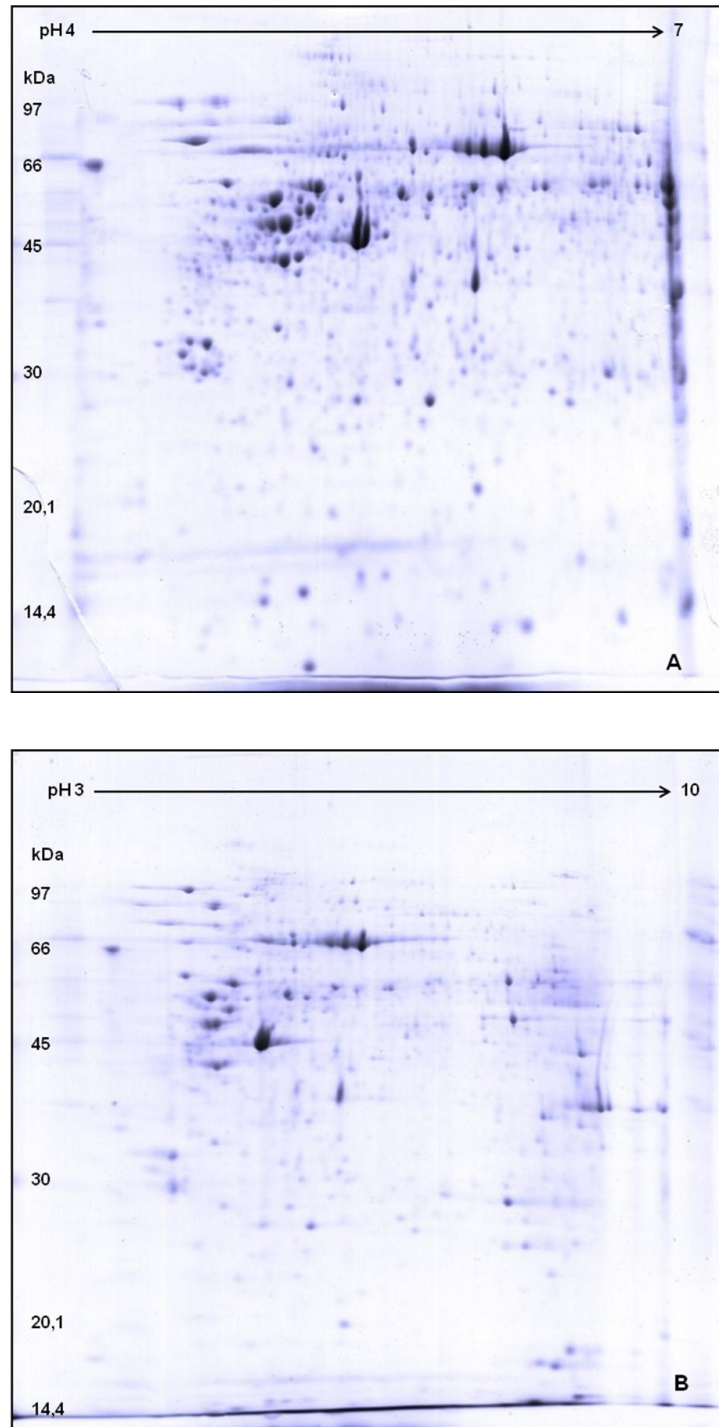


FIGURA 02 – GEL BIDIMENSIONAL DE TECIDO MAMÁRIO TUMORAL

FONTE: O autor (2010)

LEGENDA: **A** – primeira dimensão realizada em tira IPG pH 4 a 7; **B** – primeira dimensão realizada em tira IPG pH 3 a 10. A segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida 10%, corado com coomassie coloidal. Os dois géis foram realizados a partir da mesma amostra de tecido tumoral.

É importante salientar que os géis foram realizados a partir da mesma amostra de tecido tumoral, aplicando-se a mesma quantidade de proteína em ambas as tiras. Pelas imagens observa-se que mesmo restringindo a faixa de pH, a quantidade de bandas foi grande, estas bem definidas e com uma boa resolução. Por isto, as tiras de pH 4 a 7 foram escolhidas para a continuidade do estudo.

Na etapa de quantificação das proteínas pela técnica de Bradford, testou-se a possível interferência de alguns dos reagentes do tampão de lise com a solução ácida de coomassie (reagente de Bradford), especialmente detergentes. Foi realizado um experimento (TABELA 01), no qual foram efetuadas leituras de absorbância da solução de Bradford (200 µl de reagente de Bradford diluído 1:5 em água ultra pura), considerado como “branco” na quantificação, e da solução de Bradford acrescido de tampão de lise em três volumes: 1 µl (0,5%), 5 µl (2,5%) e 10 µl (5%).

TABELA 01 – RELAÇÃO DO MÉTODO DE BRADFORD COM O TAMPÃO DE LISE

Amostra	Absorbância (595nm)	Média
Solução de Bradford ("branco")	0,398	0,387
	0,376	
Tampão de lise (1µl)	0,436	0,411
	0,387	
Tampão de lise (5µl)	0,455	0,429
	0,404	
Tampão de lise (10µl)	0,588	0,532
	0,477	

FONTE: O autor (2010)

NOTA: As diferenças entre as médias, avaliadas pela análise de variância, não foram estatisticamente significativas ($F=3,60$; $p>0,05$).

As médias foram comparadas pela análise de variância e não foi observada diferença estatisticamente significativa ($F=3,60$; $p>0,05$) entre as leituras da absorbância do “branco” e as três concentrações de tampão de lise. É possível inferir que o tampão de lise não interfere no valor obtido na quantificação protéica.

Os valores das concentrações protéicas de cada amostra, e a quantidade de material utilizada para a obtenção dos extratos estão descritos no QUADRO 03.

Código	Quantidade utilizada (g)	Concentração (µg/µl)
CP 622	0,354	13,5
CP 627	0,4	11,0
CP 630	0,4	16,4
CP 633	0,4	8,4
CP 644	0,383	17,4
CP 645	0,4	14,2

QUADRO 03 – QUANTIFICAÇÕES DE PROTEÍNAS DAS AMOSTRAS

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Quantidade de tecido utilizado para extração e quantificação de proteínas. Foi utilizado todo o material das amostras CP 622 e CP 644.

6.2 ANÁLISE E DETECÇÃO DAS BANDAS DOS GÉIS BIDIMENSIONAIS

Para cada amostra foram confeccionados os géis em triplicatas, totalizando dezoito géis bidimensionais, que foram analisados pelo programa *ImageMastertm 2D Platinum v6.0* (GE Healthcare). O número de bandas detectadas em cada gel está descrito no QUADRO 04.

CP 622		CP 627		CP 630	
Gel	nº de bandas	Gel	nº de bandas	Gel	nº de bandas
T1	210	T1 (Ref.)	161	T1	211
T2 (Ref.)	234	T2	103	T2 (Ref.)	244
T3	193	T3	110	T3	201
CP 633		CP 644		CP 645	
Gel	nº de bandas	Gel	nº de bandas	Gel	nº de bandas
T1 (Ref.)	169	T1	192	T1	299
T2	110	T2	250	T2 (Ref.)	317
T3	111	T3 (Ref.)	273	T3	288

QUADRO 04 – NÚMERO DE BANDAS DETECTADAS NOS GÉIS BIDIMENSIONAIS

FONTE: O autor (2010)

NOTA: **T1**, **T2**, **T3** – géis em triplicatas de cada amostra; **Ref.** – gel de referência. Para cada amostra os géis de referência estão indicados entre parênteses.

Após a detecção das bandas e análise das triplicatas pelo programa, foi determinado um gel de referência para cada amostra (FIGURA 03). Este, geralmente é definido como o gel que melhor caracteriza a amostra, ou seja, que possui o maior número possível de bandas da triplicata e também que estas bandas estejam bem definidas. Portanto os géis de referência observados foram: 622 T2, 627 T1, 630 T2, 633 T1, 644 T3 e 645 T2 (FIGURA 04).

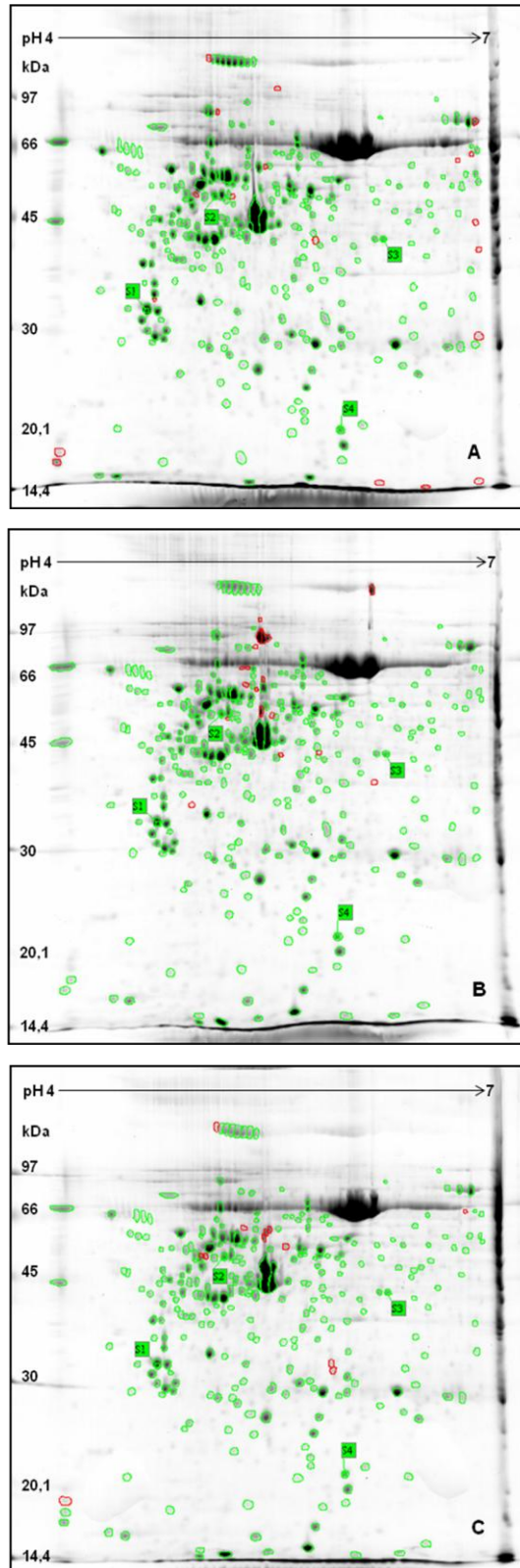


FIGURA 03 – TRIPLICATA DA AMOSTRA CP 645

FONTE: O autor (2010)

LEGENDA: **A** – Gel 645 T1; **B** – 645 T2 (escolhido como referência); **C** – 645 T3. Bandas detectadas pelo programa *ImageMaster™ 2D Platinum v6.0* destacadas em vermelho são exclusivas de cada gel. As bandas destacadas em verde foram detectadas em pelo menos dois géis da triplicata. S1, S2, S3 e S4 evidenciados pelos quadrados verdes são as bandas utilizadas no pareamento entre o gel de referência e os demais. A primeira dimensão foi realizada em tira IPG pH 4 a 7 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida 10%, corado com coomassie coloidal.

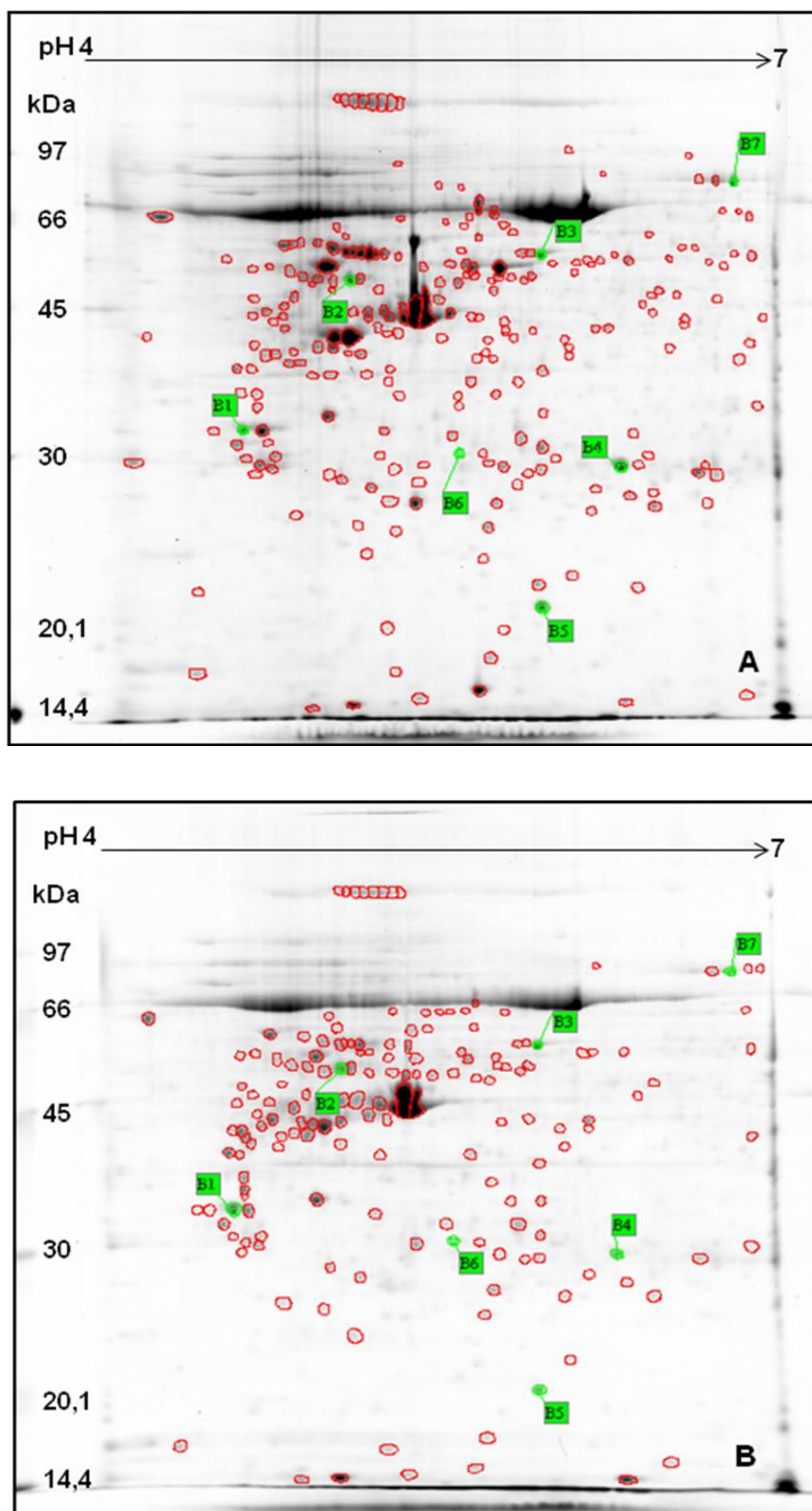


FIGURA 04 – GÉIS DE REFERÊNCIA DAS AMOSTRAS DE TECIDO MAMÁRIO TUMORAL (continua)

FONTE: O autor (2010)

LEGENDA: **A** – Gel 622 T2; **B** – Gel 627 T1. Bandas detectadas pelo programa *ImageMastertm 2D Platinum v6.0* destacadas em vermelho. B1, B2, B3, B4, B5, B6 e B7 destacadas pelo quadrado verde, representam as bandas utilizadas para pareamento entre o gel *master* (**F**) e os demais. A primeira dimensão foi realizada em tira IPG pH 4 a 7 e a segunda dimensão em gel de poliácridamida 10%, corado com coomassie coloidal.

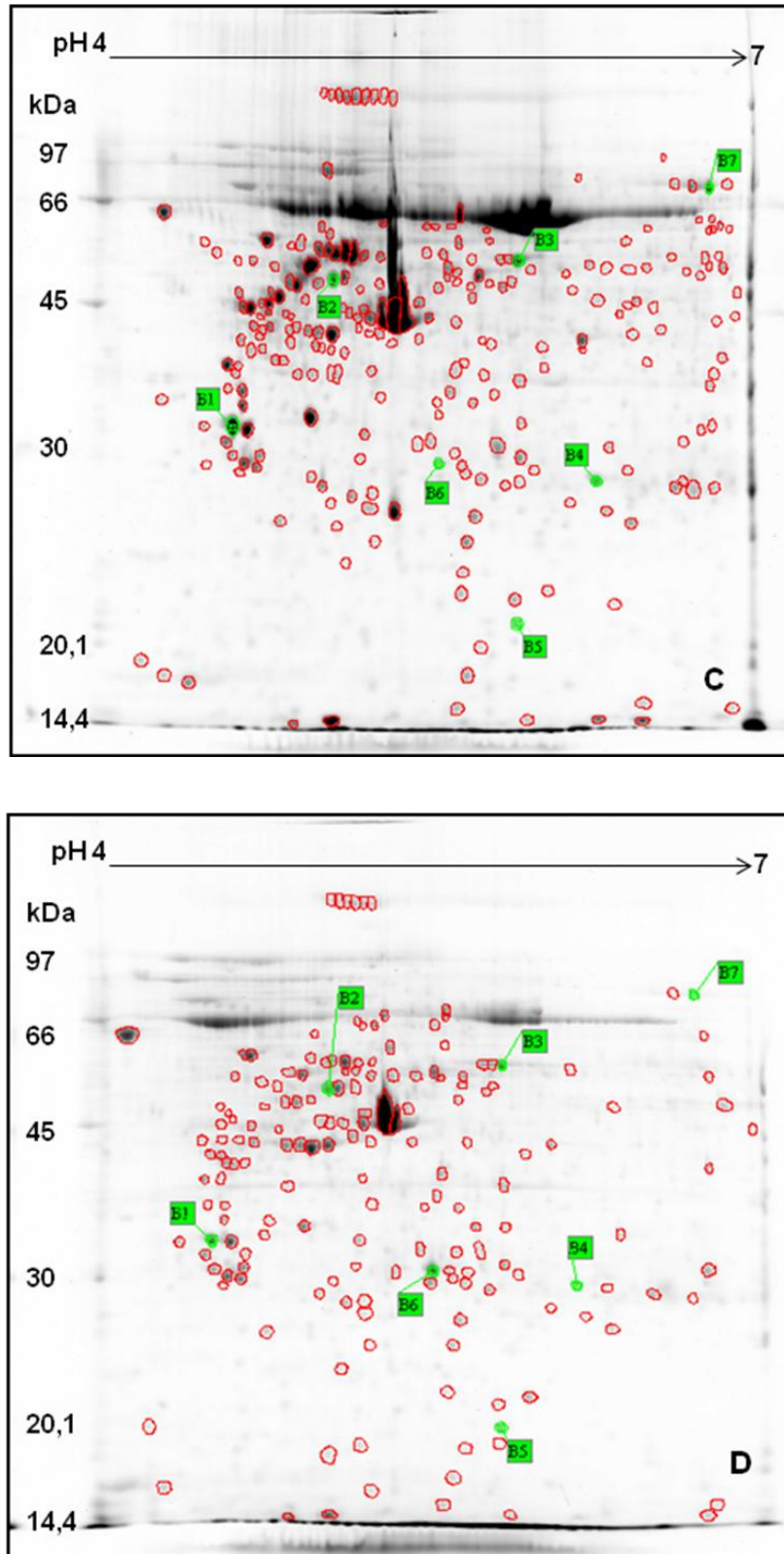


FIGURA 04 – GÉIS DE REFERÊNCIA DAS AMOSTRAS DE TECIDO MAMÁRIO TUMORAL (continuação)

FONTE: O autor (2010)

LEGENDA: **C** – Gel 630 T2; **D** – Gel 633 T1. Bandas detectadas pelo programa *ImageMaster[™] 2D Platinum v6.0* destacadas em vermelho. B1, B2, B3, B4, B5, B6 e B7 destacadas pelo quadrado verde, representam as bandas utilizadas para pareamento entre o gel *master* (**F**) e os demais. A primeira dimensão foi realizada em tira IPG pH 4 a 7 e a segunda dimensão em gel de poliácridamida 10%, corado com coomassie coloidal.

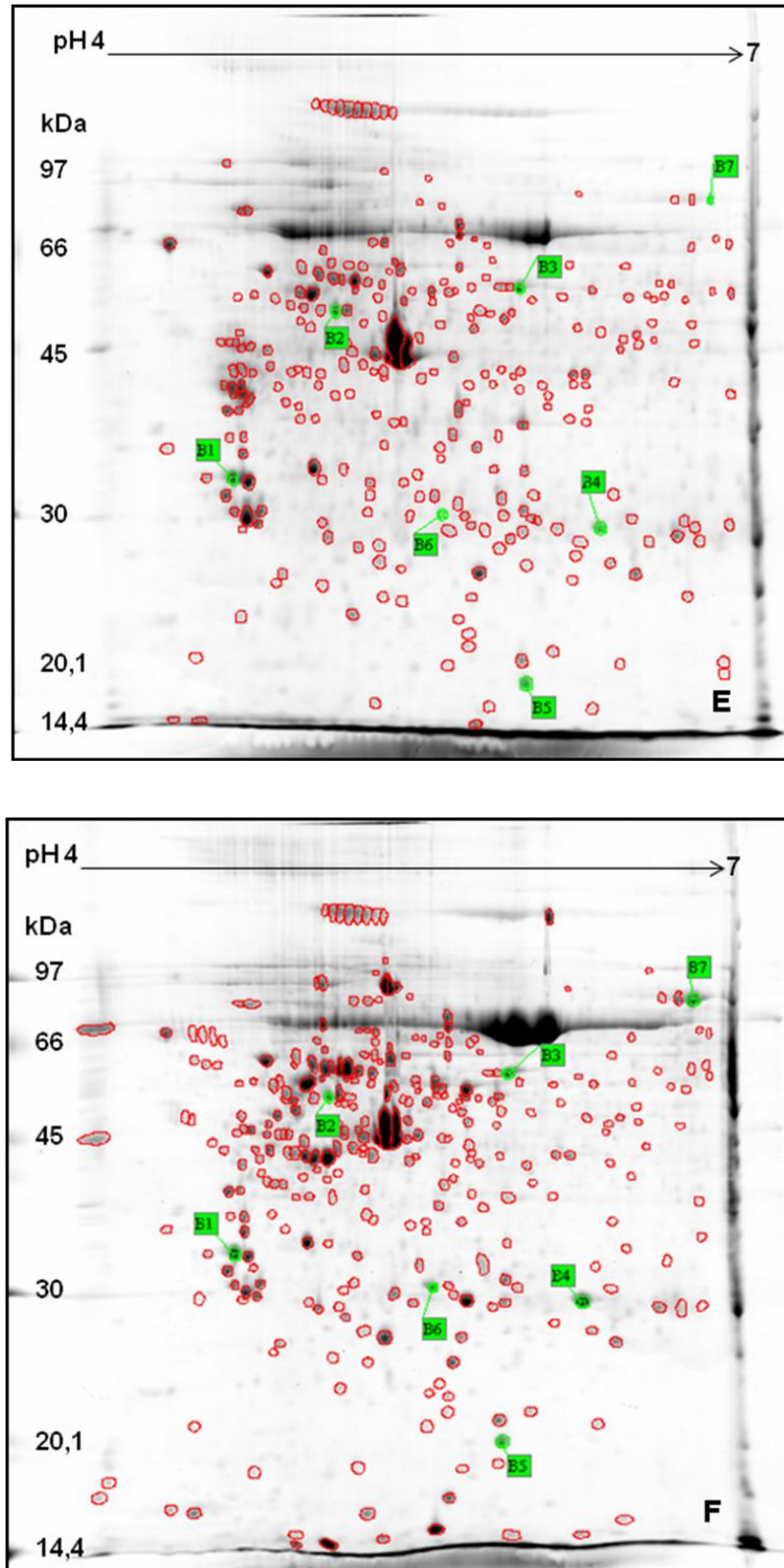


FIGURA 04 – GÉIS DE REFERÊNCIA DAS AMOSTRAS DE TECIDO MAMÁRIO TUMORAL (conclusão)

FONTE: O autor (2010)

LEGENDA: **E** – Gel 644 T3; **F** – Gel 645 T2. Bandas detectadas pelo programa *ImageMaster™ 2D Platinum v6.0* destacadas em vermelho. B1, B2, B3, B4, B5, B6 e B7 destacadas pelo quadrado verde, representam as bandas utilizadas para pareamento entre o gel *master* (**F**) e os demais. A primeira dimensão foi realizada em tira IPG pH 4 a 7 e a segunda dimensão em gel de poliácridamida 10%, corado com coomassie coloidal.

6.3 IDENTIFICAÇÃO PROTÉICA

Em seguida foi realizada a comparação entre os géis de referência de cada amostra. O gel 645 T2 foi escolhido como *master* por ser o mais representativo, este gel também foi utilizado para calcular através do programa *ImageMastertm 2D Platinum v6.0* (GE Healthcare) o pI e MM experimental para todas as proteínas identificadas. Foram detectadas 217 bandas presentes em pelo menos três amostras, sendo que 80 estavam presentes em todas as amostras (QUADRO 05). Foi definido como critério de escolha que somente as bandas detectadas em todas as amostras seriam identificadas

Essas 80 bandas comuns foram submetidas aos procedimentos para identificação, mas somente 37 (46%) haviam sido identificadas na primeira etapa. Para o restante das bandas foi realizado novamente a identificação pelo método MALDI-TOF, mas não foi obtido resultado para nenhuma delas.

Com o objetivo de aumentar a porcentagem de identificação, foi realizada nas bandas restantes a purificação peptídica através da ponteira “*PerfectPure C-18 Tip*” (Eppendorf). Esse procedimento resultou numa melhora considerável dos espectros de massas e possibilitou a identificação positiva de outras 20 bandas.

Os espectros de massas de algumas bandas e comparações entre os espectros obtidos antes e depois da purificação peptídica estão demonstrados na FIGURA 05.

Ao final dessa etapa, 57 bandas (71,25%) foram identificadas, correspondendo a 44 proteínas diferentes, conforme demonstrado na TABELA 02. A FIGURA 06 apresenta o gel 645 T2 (*master*) com as proteínas identificadas associadas às bandas correspondentes.

Detectadas em todas as amostras		Detectadas em 5 amostras		Detectadas em 4 amostras		Detectadas em 3 amostras
87	559	86	753	97	602	142
88	562	170	783	179	626	143
89	573	261	797	203	642	181
90	586	293	799	251	644	270
91	594	296	-	254	665	352
93	599	332	-	266	692	359
175	605	346	-	273	719	377
180	608	347	-	297	726	379
248	611	357	-	303	728	390
262	617	364	-	312	752	404
274	618	365	-	337	772	416
304	620	369	-	340	775	435
306	622	372	-	355	789	446
309	624	374	-	360	-	452
317	628	375	-	366	-	457
322	632	398	-	368	-	458
333	635	400	-	370	-	464
335	637	402	-	376	-	469
342	640	426	-	378	-	471
354	641	437	-	392	-	478
358	645	455	-	401	-	484
384	653	463	-	405	-	493
389	654	475	-	413	-	510
393	655	497	-	444	-	519
406	659	507	-	447	-	527
420	666	513	-	448	-	533
423	668	522	-	474	-	535
431	669	550	-	498	-	541
432	679	572	-	501	-	549
436	682	580	-	502	-	576
467	688	589	-	511	-	601
468	693	591	-	512	-	604
490	695	597	-	514	-	627
494	698	636	-	520	-	661
504	707	648	-	524	-	664
506	713	652	-	538	-	705
526	725	663	-	545	-	730
529	734	690	-	553	-	780
552	766	706	-	571	-	788
557	946	727	-	582	-	792
Total: 80		Total: 44		Total: 53		Total: 40

QUADRO 05 – RELAÇÃO DAS BANDAS DETECTADAS EM PELO MENOS 3 AMOSTRAS

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Os números atribuídos às bandas são referentes à marcação das identificações (IDs) no gel 645 T2. As 80 bandas presentes em todas as amostras foram submetidas à identificação. As bandas com identificação positiva estão destacadas em vermelho.

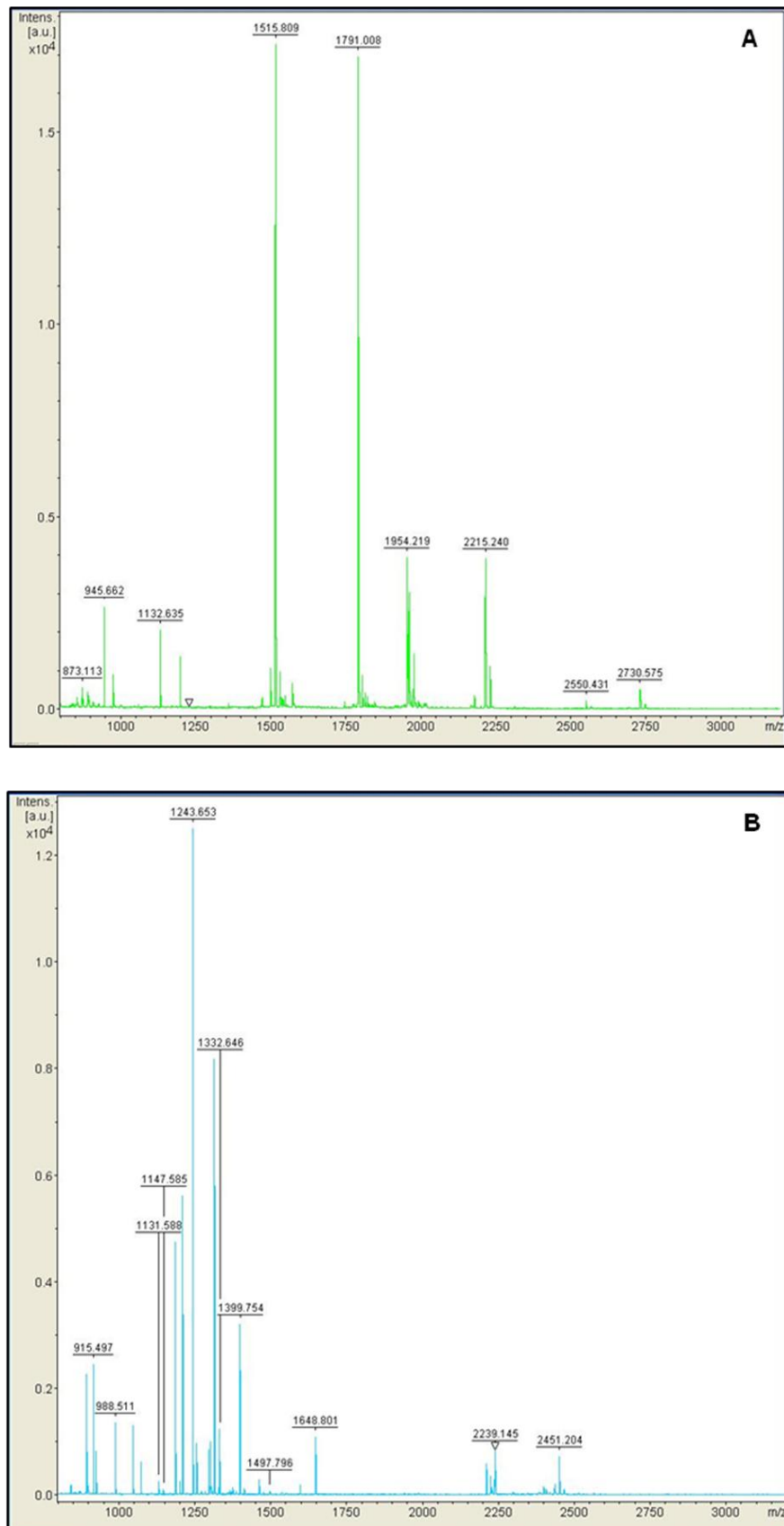


FIGURA 05 – ESPECTROS DE MASSAS (continua)

FONTE: O autor (2010)

LEGENDA: **A** – Banda 420, referente à proteína actina citoplasmática 1 e 2; **B** – Banda 599, referente à proteína tropomiosina cadeia alfa-1. Identificação obtida sem purificação peptídica.

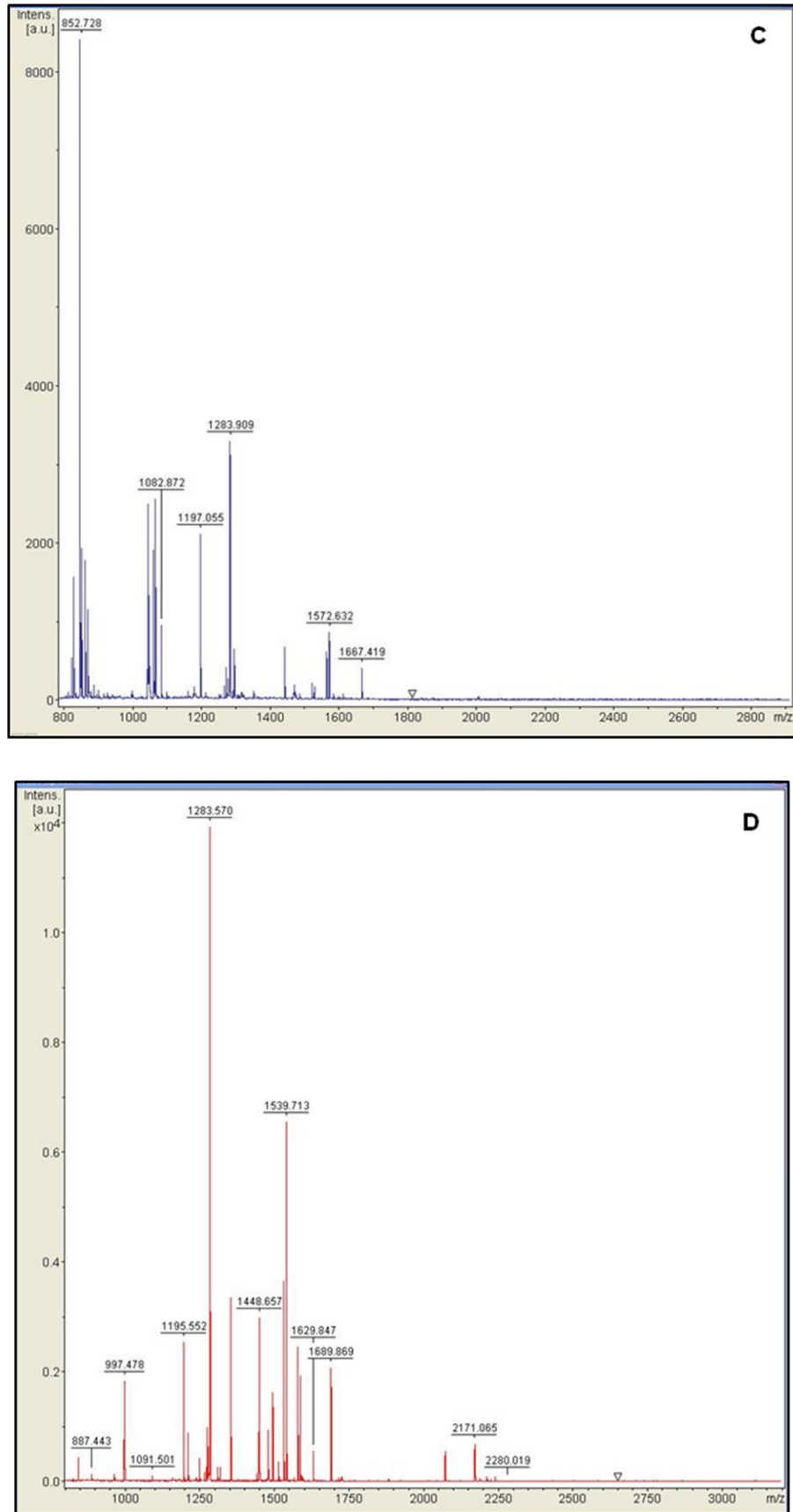


FIGURA 05 – ESPECTROS DE MASSAS (continuação)

FONTE: O autor (2010)

LEGENDA: **C** e **D** – Banda 175, referente à proteína sorotransferrina, sem (C) e com purificação peptídica (D). A identificação desta banda só foi possível após a purificação.

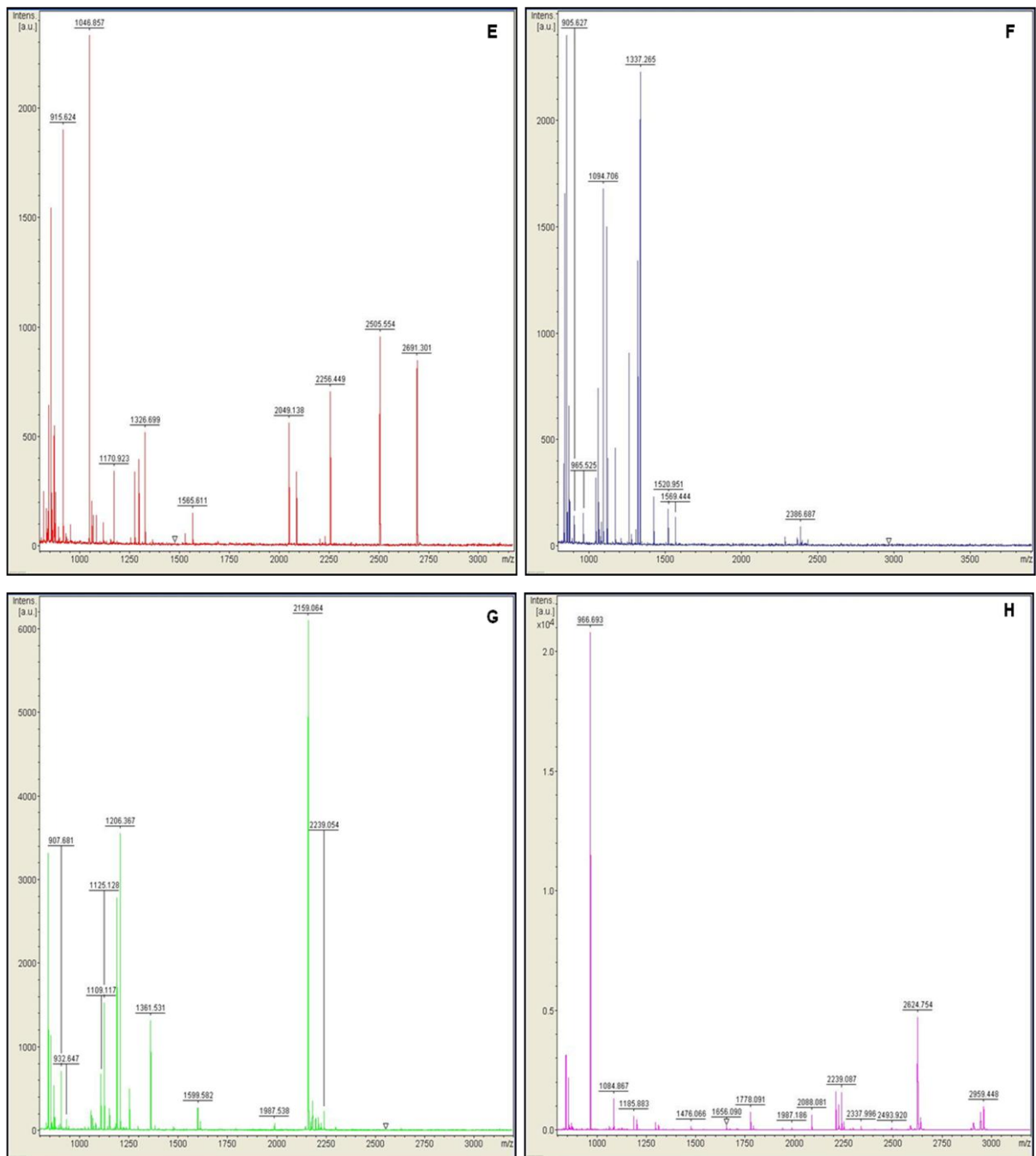


FIGURA 05 – ESPECTROS DE MASSAS (conclusão)

FONTE: O autor (2010)

LEGENDA: **E** – Banda 333; **F** – Banda 526; **G** – Banda 653; **H** – Banda 679. Bandas que não apresentaram identificação, mesmo após terem sido submetidas à purificação peptídica.

TABELA 02 – RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS (continua)

Nome da proteína (Sigla)	ID	Código <i>UniprotKB</i>	MASCOT score/ 2º score	MM (kDa)/ pI calculados	MM (kDa)/ pI observados	Cobertura de sequência (%)	Nº de peptídeos sobrepostos
Cadeia alfa-1 do colágeno VI (CO6A1)	87	P12109	58/ 35	109,6/ 5,26	137,0/ 5,15	13%	8/ 17 (47%)
	88	P12109	57/ 18	109,6/ 5,26	136,0/ 5,16	10%	9/ 23 (39%)
	89	P12109	98/ 34	109,6/ 5,26	135,0/ 5,22	12%	11/ 26 (42%)
	90	P12109	88/ 25	109,6/ 5,26	135,0/ 5,26	14%	11/ 27 (41%)
	91	P12109	81/ 31	109,6/ 5,26	135,0/ 5,30	11%	8/ 16 (50%)
	93	P12109	59/ 37	109,6/ 5,26	134,0/ 5,34	14%	7/ 18 (39%)
Soro transferrina (TRFE)	175	P02787	279/ 30	79,3/ 6,81	85,0/ 6,82	38%	24/ 33 (73%)
	180	P02787	99/ 33	79,3/ 6,81	86,0/ 6,75	25%	15/ 25 (60%)
Calreticulina (CARL)	248	P27797	80/ 21	48,2/ 4,29	69,0/ 4,13	27%	8/ 16 (50%)
Proteína 1 complexo-T subunidade épsilon (TCPE)	304	P48643	195/ 51	60,1/ 5,45	64,0/ 5,69	50%	30/ 53 (57%)
Alfa-1-Antitripsina (A1AT)	306	P01009	142/ 30	46,9/ 5,37	61,0/ 5,07	35%	12/ 30 (40%)
	322	P01009	128/ 26	46,9/ 5,37	60,0/ 5,12	37%	11/ 29 (38%)
Proteína dissulfeto-isomerase (PDIA1)	309	P07237	299/ 27	57,5/ 4,76	63,0/ 4,85	55%	24/ 34 (71%)
Tubulina cadeia alfa-1B (TBA1B)	317	P68363	126/ 30	50,8/ 4,94	60,0/ 5,22	40%	15/ 42 (36%)
Proteína dissulfeto-isomerase A3 (PDIA3)	335	P30101	165/ 34	57,1/ 5,98	59,0/ 5,97	35%	15/ 23 (65%)
Tubulina cadeia beta (TBB5)	354	P07437	229/ 146	50,1/ 4,78	57,0/ 5,04	55%	21/ 35 (60%)
Proteína dissulfeto-isomerase A6 (PDIA6)	384	Q15084	97/ 32	48,5/ 4,95	54,0/ 5,19	21%	7/ 14 (50%)
Subunidade beta da ATP sintase mitocondrial (ATPB)	389	P06576	70/ 37	56,5/ 5,26	53,0/ 5,14	15%	7/ 29 (24%)
Cadeia gama do fibrinogênio (FIBG)	393	P02679	74/ 24	52,1/ 5,37	54,0/ 5,92	19%	7/ 20 (35%)
Proteína tipo-actina 3 (ARP3)	406	P61158	79/ 28	47,8/ 5,61	53,0/ 5,90	22%	8/ 17 (47%)
Actina citoplasmática 1 (ACTB); Actina citoplasmática 2 (ACTG)	420	P60709	84/ 51	42,0/ 5,29	46,0/ 5,40	29%	9/ 40 (23%)
		P63261	84/ 51	42,1/ 5,31	46,0/ 5,40	29%	9/ 40 (23%)
	431	P60709	104/ 39	42,0/ 5,29	46,0/ 5,45	29%	9/ 19 (47%)
		P63261	104/ 39	42,1/ 5,31	46,0/ 5,45	29%	9/ 19 (47%)
	468	P60709	86/ 26	42,0/ 5,29	45,0/ 5,30	26%	8/ 19 (42%)
		P63261	86/ 26	42,1/ 5,31	45,0/ 5,30	26%	8/ 19 (42%)
	490	P60709	89/ 39	42,0/ 5,29	44,0/ 5,25	25%	8/ 18 (44%)
		P63261	89/ 39	42,1/ 5,31	44,0/ 5,25	25%	8/ 18 (44%)

TABELA 02 – RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS (continuação)

Nome da proteína (Sigla)	ID	Código <i>UniprotKB</i>	MASCOT score/ 2º score	MM (kDa)/ pI calculados	MM (kDa)/ pI observados	Cobertura de sequência (%)	Nº de peptídeos sobrepostos
Inibidor da ribonuclease (RINI)	432	P13489	161/ 35	51,8/ 4,71	50,0/ 4,74	39%	13/ 19 (68%)
Proteína ribossomal 40S (RSSA)	467	P08865	127/ 26	32,9/ 4,79	46,0/ 4,85	38%	9/ 23 (39%)
Vimentina (VIME)	494	P08670	158/ 31	53,7/ 5,06	44,0/ 4,87	37%	18/ 51 (35%)
	946	P08670	86/ 28	53,7/ 5,06	61,0/ 5,12	29%	11/ 34 (32%)
Queratina do citoesqueleto tipo I – 19 (K1C19)	504	P08727	280/ 39	44,1/ 5,04	43,0/ 5,07	58%	22/ 33 (67%)
Haptoglobina (HPT)	506	P00738	70/ 25	45,9/ 6,13	43,0/ 5,34	14%	5/ 8 (63%)
Tropomiosina cadeia alfa-4 (TPM4)	557	P67936	59/ 53	28,6/ 4,67	39,0/ 4,68	11%	5/ 10 (50%)
	611	P67936	99/ 25	28,6/ 4,67	33,0/ 4,71	34%	9/ 25 (36%)
Tropomiosina cadeia alfa-1 (TPM1)	586	P09493	112/ 43	32,7/ 4,69	37,0/ 4,75	26%	9/ 18 (50%)
	599	P09493	138/ 54	32,7/ 4,69	35,0/ 4,75	37%	14/ 35 (40%)
Pirofosfatase inorgânica (IPYR)	594	Q15181	86/ 31	33,1/ 5,54	36,0/ 5,75	26%	6/ 9 (67%)
Anexina A5 (ANXA5)	605	P08758	146/ 29	36,0/ 4,94	34,0/ 5,04	40%	13/ 29 (45%)
Anexina A4 (ANXA4)	608	P09525	110/ 29	36,1/ 5,84	34,0/ 5,96	26%	9/ 14 (64%)
Tropomiosina cadeia alfa-3 (TPM3)	617	P06753	100/ 38	32,8/ 4,68	33,0/ 4,77	24%	9/ 18 (50%)
Proteína canal de cloro intracelular 1 (CLIC1)	620	O00299	86/ 29	27,2/ 5,09	33,0/ 5,27	30%	6/ 13 (46%)
Complexo ativador do proteassoma subunidade 2 (PSME2)	624	Q9UL46	69/ 26	27,5/ 5,44	32,0/ 5,56	21%	5/ 12 (42%)
Proteína 14-3-3 épsilon (1433E)	628	P62258	123/ 31	29,3/ 4,63	32,0/ 4,67	40%	12/ 22 (55%)
Complexo ativador do proteassoma subunidade 1 (PSME1)	632	Q06323	143/ 32	28,9/ 5,78	31,0/ 5,96	52%	13/ 25 (52%)
Proteína 14-3-3 gama (1433G)	635	P61981	87/ 28	28,4/ 4,8	31,0/ 4,82	35%	10/ 28 (36%)
Proteína 14-3-3 teta (1433T)	637	P27348	129/ 46	28,0/ 4,68	31,0/ 4,71	33%	8/ 8 (100%)
Proibitina (PHB)	640	P35232	119/ 28	29,8/ 5,57	31,0/ 5,69	31%	8/ 19 (42%)
Caspase-14 (CASPE)	641	P31944	76/ 34	27,9/ 5,44	31,0/ 5,62	31%	9/ 22 (41%)
Proteína 14-3-3 zeta/ delta (1433Z)	645	P63104	119/ 31	27,9/ 4,73	30,0/ 4,76	46%	12/ 28 (43%)
Proteína <i>heat shock</i> beta-1 (HSPB1)	654	P04792	71/ 26	22,8/ 5,98	30,0/ 5,78	28%	5/ 24 (21%)
	655	P04792	99/ 28	22,8/ 5,98	30,0/ 6,17	33%	7/ 18 (39%)
Peroxiredoxina-6 (PRDX6)	668	P30041	111/ 28	25,1/ 6,00	29,0/ 6,67	37%	8/ 18 (44%)

TABELA 02 – RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS (conclusão)

Nome da proteína (Sigla)	ID	Código <i>UniprotKB</i>	MASCOT score/ 2º score	MM (kDa) / pI calculados	MM (kDa)/ pI observados	Cobertura de seqüência (%)	Nº de peptídeos sobrepostos
Inibidor de dissociação Rho GDP 1 (GDIR1)	669	P52565	99/ 27	23,2/ 5,02	29,0/ 5,09	31%	7/ 10 (70%)
Glutathione S-transferase P (GSTP1)	693	P09211	94/ 29	23,6/ 5,43	27,0/ 5,75	50%	7/ 31 (23%)
Proteína DJ-1 (PARK7)	695	Q99497	74/ 28	20,0/ 6,33	26,0/ 6,47	37%	8/ 38 (21%)
Peroxiredoxina-2 (PRDX2)	707	P32119	112/ 27	22,0/ 5,66	25,0/ 5,75	43%	7/ 21 (33%)
Nucleotídeo difosfato quinase A (NDKA)	725	P15531	84/ 42	17,3/ 5,83	22,0/ 6,08	44%	7/ 14 (50%)
Superóxido dismutase (Cu/Zn) (SODC)	734	P00441	47/ 28	16,1/ 5,70	20,0/ 5,94	32%	3/ 20 (15%)
Transtiretina (TTHY)	766	P02766	60/ 20	16,0/ 5,52	17,0/ 5,70	48%	4/ 14 (29%)

FONTE: O autor (2010)

NOTA: As bandas cujas identificações foram obtidas apenas após purificação protéica estão destacadas com fundo cinza. MASCOT score: é o valor atribuído à identificação da proteína pelo programa de busca. Percentual da cobertura de seqüência: este valor indica o quanto da seqüência de aminoácidos da proteína sugerida foi coberto pelos peptídeos resultantes da digestão triptica da amostra. Número de peptídeos sobrepostos: corresponde aos picos de massa obtidos com a MS e que foram pareados com as massas teóricas, provenientes da clivagem *in silico*.

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Proteínas identificadas associadas às bandas no gel 645 T2 (*master*). As bandas foram detectadas pelo programa *ImageMaster[™] 2D Platinum v6.0*. Todas as identificações positivas estão demonstradas através das siglas (obtidas do banco de dados do *UniProtKB/ Swiss-Prot*) das proteínas ligadas às suas respectivas bandas. A primeira dimensão foi realizada em tira IPG pH 4 a 7 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida 10%, corado com coomassie coloidal.

Através das informações obtidas na literatura e nos bancos de dados *UniProtKB/ Swiss-Prot* (<http://www.expasy.ch/>) e NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) as proteínas identificadas foram classificadas de acordo com sua função biológica, principalmente em citoesqueleto e proteínas associadas (25%), proteínas com função de ligação (16%) e chaperonas moleculares/ proteínas heat shock (14%) (GRÁFICO 01).

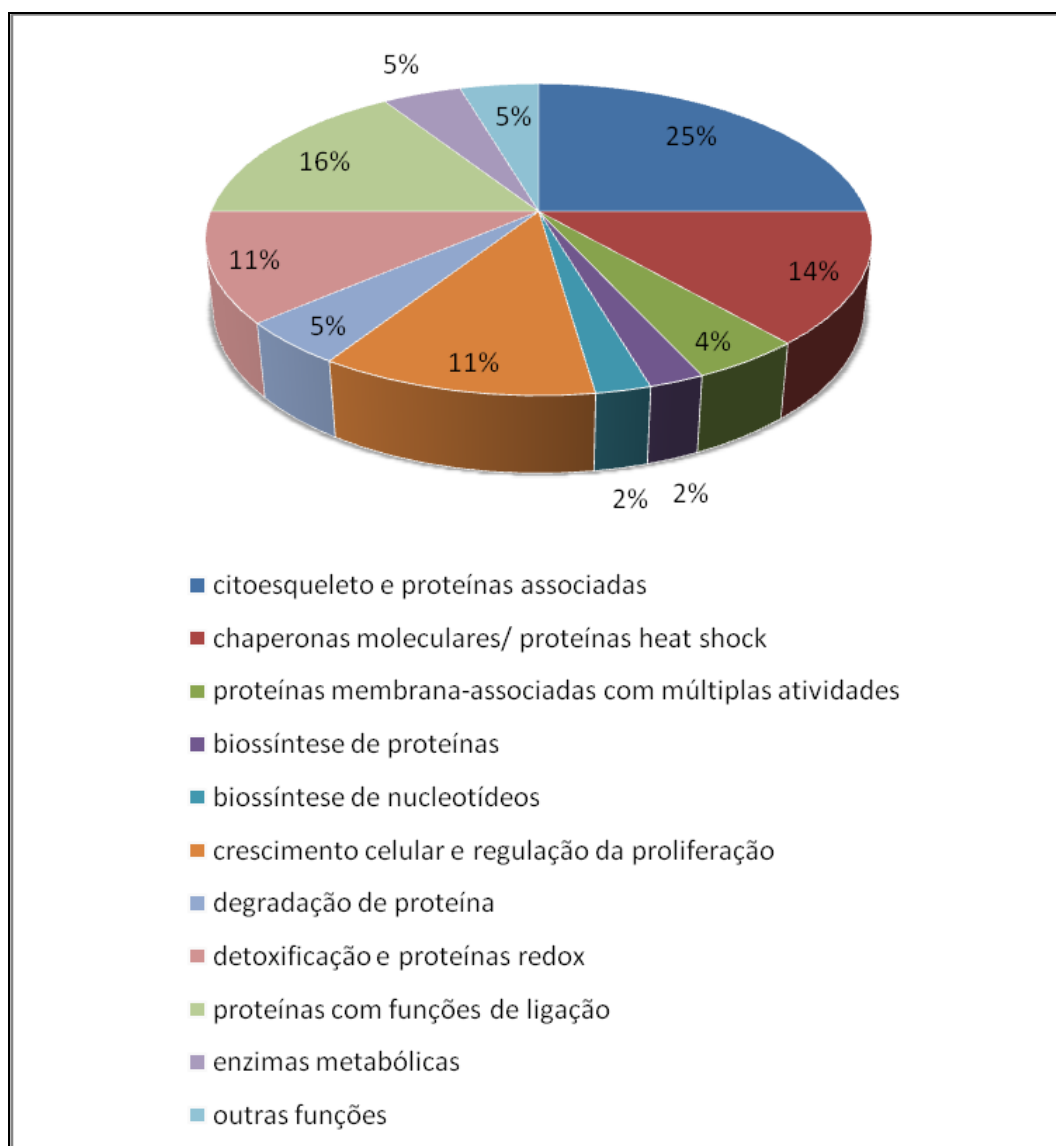


GRÁFICO 01 – CLASSIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Distribuição das 44 proteínas identificadas de acordo com sua função biológica em 11 categorias. A classificação foi feita com base nas informações disponíveis na literatura e nos bancos de dados do *UniProtKB/ Swiss-Prot* e do NCBI.

7. DISCUSSÃO

7.1 IMPLANTAÇÃO DA METODOLOGIA PROTEÔMICA

A proteômica objetiva não só a identificação protéica, mas também informar sobre as interações e interdependências das mesmas nos processos biológicos.

Pela avaliação do desenvolvimento deste trabalho infere-se que a metodologia proteômica foi implantada com sucesso no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Foi realizada a padronização do método de extração de proteínas de tecido mamário tumoral, bem como da eletroforese bidimensional (2D-PAGE).

A metodologia da eletroforese bidimensional é dependente de uma boa preparação da amostra, a fim de obter-se uma alta reprodutibilidade, uma boa resolução e um grande número de bandas no gel. Uma das dificuldades encontradas no início deste trabalho foi em relação a obtenção dos extratos protéicos. Pelo tecido tumoral mamário apresentar um aspecto fibroso, a lise do material foi bem trabalhosa, resultando num volume pequeno de extrato. Outro problema encontrado no momento da desagregação do tecido foi o surgimento de espuma, provavelmente devido a presença de surfactante (CHAPS) no tampão de lise, o que resultou numa pequena perda de material. Apesar disto foram obtidos os géis em triplicatas para as seis amostras. A análise dos géis através do programa *ImageMastertm 2D Platinum v6.0* (GE Healthcare) foi realizada com sucesso.

Não é uma tarefa simples analisar por proteômica o tecido mamário, principalmente devido a mudanças hormonais que podem alterar a expressão das proteínas. Isto pode explicar a variação que foi observada no número de bandas detectadas para cada uma das amostras.

7.2 ANÁLISE DOS ESPECTROS DE MASSA

Neste estudo as proteínas foram identificadas pelo método PMF (*peptide mass fingerprinting*). Para a digestão proteolítica foi utilizada a enzima tripsina, que atua na clivagem da sequência de aminoácidos após os resíduos de lisina e arginina. Portanto cada proteína apresenta um padrão único de digestão enzimática, característica fundamental para o processo de identificação.

Analisando os espectros de massa, antes mesmo de submeter as informações no programa de busca MASCOT, é possível obter várias informações sobre a amostra e a qualidade da identificação protéica. Isto é devido à quantidade de picos de massa e sua intensidade, sinais de matriz e ruído. Podem interferir nestes aspectos fatores como quantidade de peptídeos presentes na amostra, calibração do aparelho (interna e externa) e a intensidade do *laser* para a ionização dos peptídeos. Este último interfere de um modo ambíguo, quanto maior a intensidade do *laser*, maior é a dos picos, entretanto isto pode resultar num aumento do ruído na porção inferior do gráfico, que pode atrapalhar a identificação pelo programa de busca. Outro fator importante é a quantidade de material utilizado, já que pequenas quantidades do mesmo resultam numa maior ionização da matriz gerando poucos espectros dos peptídeos.

Das 23 bandas não identificadas, a grande maioria apresentou espectros de massa, entretanto estes estavam com uma qualidade muito baixa, predominando sinais de contaminantes e dos calibrantes. Mesmo assim estes picos de massa foram submetidos ao programa de busca, mas nenhuma identificação foi obtida. Das 57 bandas identificadas, 20 apresentaram uma qualidade boa de espectros somente após a purificação peptídica através da “*PerfectPure C-18 Tip*” (Eppendorf). Com a utilização destas ponteiras de fase reversa foi observado um aumento do número e da intensidade dos espectros, bem como uma diminuição dos sinais de matriz. Para quatro bandas, mesmo utilizando estas ponteiras, não foi possível realizar a identificação, pois a intensidade dos espectros de massa estava muito baixa.

7.3 PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POSITIVAMENTE

Baseado na comparação entre os valores teóricos de massa molecular (MM) e ponto isoelétrico (pI) para cada banda e os valores obtidos nos géis, observou-se que a maioria das bandas (65%) foram identificadas na posição esperada nos géis. Este resultado foi obtido com base nos parâmetros ($\Delta MM < 20\%$ e $\Delta pI < 0,6$) utilizados por DUPONT *et al.* (2005). Os parâmetros para cada uma das bandas estão representados no APÊNDICE. As 20 bandas que diferiram da localização esperada no gel apresentaram variação principalmente em relação à massa molecular, somente duas bandas exibiram uma diferença de pI maior que 0,6. As proteínas que se localizaram fora da variação esperada serão discutidas posteriormente.

Em alguns casos, diferentes bandas foram identificadas como sendo a mesma proteína. As diferenças entre massa molecular e/ ou ponto isoelétrico observados e teóricos entre estas bandas são devido a presença de diferentes isoformas da mesma proteína. Aproximadamente 16% das 44 proteínas identificadas estavam representadas por múltiplas bandas. Isto pode ser devido às modificações pós-traducionais (MPT) às quais muitas proteínas estão sujeitas e que são frequentemente necessárias para que exerçam sua função biológica. Estas modificações também podem alterar a meia-vida ou a localização da proteína (ONG e PANDEY, 2001).

7.4 MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS (MPT)

Com base nos bancos de dados *UniProtKB/ Swiss-Prot* e *PhosphoSitePlus* (www.phosphosite.org) sugere-se que para as proteínas identificadas neste estudo, as modificações pós-traducionais (MPT) mais frequentes foram fosforilação, glicosilação e acetilação. As MPT desempenham papéis essenciais na regulação biológica da célula. São modificações químicas covalentes na estrutura protéica, geralmente catalisadas por enzimas específicas. Estas modificações são importantes, porque alteram as propriedades físicas e químicas da proteína, sua conformação, atividade, localização celular e estabilidade (FARLEY e LINK, 2009).

A fosforilação reversível de resíduos de serina, treonina e tirosina é provavelmente a MPT mais estudada. Estima-se que 30% do proteoma humano é fosforilado. Esta modificação influencia um grande número de processos celulares como apoptose, migração, transcrição e tradução protéica. A fosforilação anormal de vias de transdução de sinal pode alterar propriedades de crescimento do tumor mamário (FARLEY e LINK, 2009; JIN e ZANGAR, 2009). Esta MPT altera o ponto isoelétrico das proteínas, de acordo com a quantidade de resíduos fosforilados, deslocando-o no sentido ácido. Sabe-se que a fosforilação causa maiores variações em proteínas com pI acima de 7,0 (ZHU *et al.*, 2005).

Glicosilação é uma MPT comum que afeta atividade enzimática, vias de sinalização, localização e estabilidade de proteínas, adesão celular e interações protéicas. Alterações nos padrões de glicosilação na superfície celular e de proteínas em fluidos biológicos foram descobertos nos processos de tumorigênese. Entre as modificações pós-traducionais, as glicosilações são as que mais influenciam na variação de massa, pela introdução de uma variedade de cadeias de açúcares na estrutura das proteínas (FARLEY e LINK, 2009).

Em eucariotos a acetilação na região amino-terminal é uma das MPT mais comuns, ocorrendo em aproximadamente 85% das células. Esta modificação ocorre principalmente nos resíduos de lisina, e apresenta importante função de regulação das histonas e na estabilidade de proteínas (FARLEY e LINK, 2009). A alteração é resultante do aumento das cargas negativas como resultado da substituição de grupamentos amino, positivamente carregados, por grupos hidrofóbicos acetil com carga neutra, modificando o pI no sentido ácido (RAMOS e BORA, 2004).

7.5. CLASSIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

A organização das proteínas em categorias funcionais é fundamental para o desenvolvimento de mecanismos válidos para o estudo das funções bioquímicas das células e seu envolvimento no câncer (MINAFRA *et al.*, 2006).

As categorias nas quais, as proteínas foram classificadas, tiveram como base um estudo de MINAFRA *et al.* (2006), que elaboraram um catálogo de proteínas a partir do mapa de referência de uma linhagem celular neoplásica de tecido mamário. O critério escolhido foi baseado nas principais funções biológicas que cada proteína

apresenta. No entanto estas classificações funcionais devem ser tratadas com cuidado, pois elas estão sujeitas a mudanças, e algumas proteínas podem apresentar diversas funções (OU *et al.*, 2008).

As categorias foram divididas em: citoesqueleto e proteínas associadas, chaperonas moleculares/ proteínas *heat shock*, proteínas membrana-associadas com múltiplas atividades, biossíntese de proteínas, biossíntese de nucleotídeos, crescimento celular e regulação da proliferação, degradação protéica, detoxificação e proteínas redox, proteínas com função de ligação, enzimas metabólicas e proteínas com outras funções.

7.5.1 Citoesqueleto e proteínas associadas

Neste trabalho a maioria das proteínas identificadas faz parte da classe **Citoesqueleto e proteínas associadas**. O citoesqueleto é um sistema complexo e dinâmico que compreende proteínas estruturais formando polímeros (actina, tubulina e filamentos intermediários) e proteínas associadas com funções regulatórias. Está direta ou indiretamente envolvido em diversos processos celulares importantes como, por exemplo, polaridade celular, adesão, transporte intracelular, transdução de sinal e movimento celular. Alterações no citoesqueleto associadas ao câncer estão bem documentadas e até mesmo são utilizadas no diagnóstico da doença, inclusive no câncer de mama (MINAFRA *et al.*, 2006).

Nessa categoria 16 bandas foram detectadas, correspondendo a 11 proteínas diferentes: **actina citoplasmática 1** e **actina citoplasmática 2** (quatro isoformas); **vimentina** (duas isoformas); **queratina do citoesqueleto tipo I – 19**; **tubulina cadeia alfa-1B**; **tubulina cadeia beta**; **tropomiosina cadeia alfa-1** (duas isoformas); **tropomiosina cadeia alfa-3**; **tropomiosina cadeia alfa-4** (duas isoformas); **proteína tipo-actina 3** e **inibidor de dissociação RhoGDP 1**.

As actinas são proteínas extremamente conservadas evolutivamente e são fundamentais para as células eucarióticas (MINAFRA *et al.*, 2006). As células do câncer podem se mover no interior dos tecidos durante a invasão e metástase por sua própria motilidade. O citoesqueleto de actina e suas proteínas reguladoras são cruciais para a migração celular. Durante este processo, as actinas são remodeladas, e esta reorganização produz a força necessária para a migração celular. Devido à inibição destes eventos, ocorre uma diminuição da motilidade

celular, portanto, a elucidação dos mecanismos moleculares de reorganização da actina é importante para o tratamento do câncer (YAMAZAKI *et al.*, 2005).

Actina citoplasmática 1 (beta) e 2 (gama) são altamente homólogas, diferindo apenas em quatro aminoácidos na região amino-terminal. Por serem muito semelhantes entre si a distinção por PMF é difícil. É comum encontrar em trabalhos científicos, que se baseiam neste método para identificação, a detecção dessas proteínas simultaneamente em uma mesma banda (DUPONT *et al.*, 2005; MINAFRA *et al.*, 2006). Estas duas proteínas foram identificadas nas bandas 420, 431, 468 e 490 (FIGURA 07) com os mesmos valores de *score*, cobertura de seqüência e número de peptídeos sobrepostos. Com as informações obtidas através do programa MASCOT foi considerada que as duas proteínas estavam presentes em cada uma das bandas, portanto, os dois tipos foram considerados na determinação do número total de proteínas identificadas. Para distinção entre os tipos de actina seria necessária a obtenção da seqüência de aminoácidos através de espectrometria de massa em *tandem* (MS/ MS).

De acordo com o banco de dados do NCBI (2010), a actina citoplasmática 1 é codificada pelo gene *ACTB* (*actin, beta*) localizado no cromossomo 7 (7p15-p12), enquanto que a actina citoplasmática 2 é codificada pelo gene *ACTG1* (*actin, gamma 1*), localizado no cromossomo 17 (17q25).

As isoformas encontradas apresentaram uma distribuição pelo gel bem semelhante com o que era esperado de acordo com os bancos de dados; foi observada uma pequena variação de massa molecular de 44 a 46 kDa e o *pI* variando de 5,25 a 5,45 (FIGURA 07).

MALORNI *et al.* (2006) analisando por proteômica linhagens celulares de câncer de mama expostas a estradiol, localizaram somente uma forma da actina citoplasmática 2, enquanto que MINAFRA *et al.* (2006) trabalhando com linhagens celulares neoplásicas de mama encontraram as duas proteínas em oito bandas, apresentando uma pequena variação de MM/ *pI* similares às encontradas neste estudo.

OU *et al.* (2008) compararam pela técnica de proteômica duas linhagens celulares neoplásicas mamárias e uma não maligna, e amostras de tecido com carcinoma primário de mama, os autores obtiveram 27 isoformas para a actina citoplasmática 2. Eles sugerem que proteínas com estruturas primárias similares e massas moleculares próximas, como no caso das actinas encontradas neste estudo,

podem migrar juntas pelo gel, explicando a presença de duas proteínas numa mesma banda.

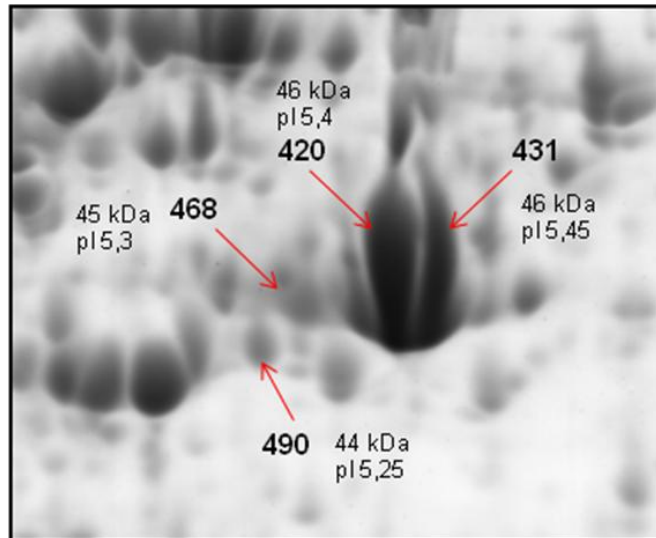


FIGURA 07 – DETALHE DAS BANDAS DA PROTEÍNA ACTINA CITOPLASMÁTICA 1 E 2

FONTE: O autor (2010)

As setas indicam as isoformas da proteína actina citoplasmática 1 e 2 (bandas 420, 431, 468 e 490), com seus respectivos valores de massa molecular (em quilodalton) e ponto isoelétrico.

A vimentina (bandas 494 e 946) e a queratina do citoesqueleto tipo I – 19 (banda 504), também denominada de citoqueratina 19 (K19), são membros da família dos filamentos intermediários. As proteínas desta família são conhecidas por seu papel estrutural como componentes do citoesqueleto e por sua especificidade ao tipo de célula. Os filamentos intermediários são um dos três maiores componentes do citoesqueleto nas células eucarióticas, juntamente com os microtúbulos e microfilamentos. Há evidências do envolvimento desta família em uma variedade de funções celulares, inclusive na invasão por células tumorais, motilidade e transdução de sinais (THOMAS *et al.*, 1999). É provável que as proteínas destes filamentos e suas subunidades constituintes desempenhem um papel crucial na transmissão de sinais específicos da periferia celular para o núcleo em vários tipos diferentes de células (HELFAND *et al.*, 2005).

Durante décadas, as proteínas da família dos filamentos intermediários têm sido utilizadas como marcadores moleculares no diagnóstico histopatológico. Evidências sugerem que a expressão aberrante de vimentina ou citoqueratinas resulta em um comportamento celular anormal (WILLIPINSKI-STAPELFELDT *et al.*, 2005). É importante mencionar que a co-expressão de citoqueratinas e vimentina

reflete uma transição epitélio-mesenquimal típica das células do câncer de mama, THOMAS *et al.* (1999) utilizando um modelo “*in vitro*” analisaram esta relação e observaram que as células positivas para a co-expressão destas duas proteínas apresentaram um aumento das taxas de proliferação, potencial invasivo e tumorigenicidade quando comparadas com controles negativos, estes exibindo baixo potencial de invasão.

MINAFRA *et al.* (2006) observaram que as formas truncadas das proteínas dos filamentos intermediários são frequentemente encontradas em tumores malignos e contribuem para a transdução de sinais.

A vimentina é codificada pelo gene *VIM* (*vimentin*), localizado no cromossomo 10 (10p13) (NCBI, 2010). Esta proteína foi observada em duas bandas, em posições distintas no gel (FIGURA 08). MINAFRA *et al.* (2006) analisando linhagens celulares neoplásicas de mama, obtiveram 7 isoformas desta mesma proteína com uma variação de MM/ pI entre elas similar com o que foi exibido neste estudo. LUO *et al.* (2005) em análise comparativa utilizando tecido mamário normal e tecido com carcinoma ductal invasor, relataram somente uma banda para a vimentina com valores de MM/ pI muito próximos aos observados para a banda 494.

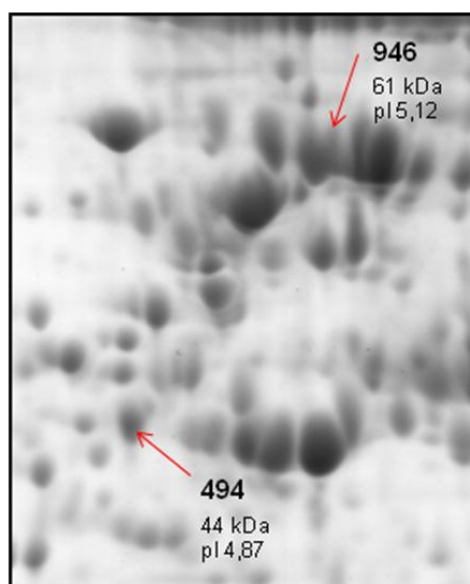


FIGURA 08 – DETALHE DAS BANDAS DA PROTEÍNA VIMENTINA

FONTE: O autor (2010)

As setas indicam as isoformas da proteína vimentina (bandas 494 e 946), com seus respectivos valores de massa molecular (em quilodalton) e ponto isoelétrico.

As queratinas apresentam uma série de características, que as permitem serem utilizadas como marcadores protéicos. Elas são abundantes, antigênicas, e podem identificar com segurança as células de origem epitelial (TRASK *et al.*, 1990).

A citoqueratina 19 (K19) é codificada pelo gene *KRT19* (*keratin 19*), localizado no cromossomo 17 (17q21.2) (NCBI, 2010). A proteína foi identificada em uma banda do gel com valores de MM/ pI observados (43 kDa/ 5,07) muito próximos aos esperados (44,1 kDa / 5,04). As queratinas produzidas nas células normais foram K5, K6, K7, K14 e K17, enquanto que nas células tumorais foram K8, K18, K19.

Esta distribuição foi secundariamente confirmada em amostras tumorais, sendo que a imunodeteção das citoqueratinas é eventualmente utilizada para ajudar a diferenciar células benignas de malignas em lâminas histopatológicas (HONDERMARCK, 2008).

No estudo de CHUTHAPISITH *et al.* (2007), envolvendo uma linhagem celular TRASK *et al.* (1990) analisando células epiteliais de tumores mamários observaram que o padrão geral de expressão da proteína queratina é muito diferente em linhagens celulares normais e tumorais. Neoplásica de tecido mamário e a quimioresistência a diferentes tipos de drogas contra o câncer, foi observado que houve uma diminuição na expressão das proteínas K8 e K19 nas células do câncer de mama resistentes às drogas *adriamycin* e *paclitaxel*. Há também evidências de que a perda de expressão das citoqueratinas, incluindo K8 e K19, está associada com a agressividade de tumores de mama "*in vivo*".

WILLIPINSKI-STAPELFELDT *et al.* (2005) em trabalho com células de carcinoma primário de mama observaram que a diminuição da expressão da K19 e a super expressão da vimentina foram encontradas em linhagens celulares de câncer de mama altamente agressivas que exibem grande capacidade migratória e invasiva.

Os microtúbulos também estão envolvidos em diversos processos essenciais, incluindo a divisão celular, motilidade ciliar e flagelar e transporte intracelular (McKEAN *et al.*, 2001). Experimentos demonstraram que a alfa e a beta tubulina formam um heterodímero que é o principal constituinte dos microtúbulos. As alfa-tubulinas compartilham 36-42% de identidade com as beta-tubulinas, constituindo, assim, duas famílias altamente conservadas de proteínas dentro da superfamília das tubulinas (OAKLEY, 2000).

A banda 317 foi identificada como tubulina cadeia alfa-1B com o *score* de 126; para esta mesma banda o programa MASCOT indicou as tubulinas cadeias alfa 1A, 1C e 4A com os *scores* 108, 91 e 75 respectivamente, todos acima do mínimo (56) para que a identificação não fosse considerada aleatória, ou seja, ao acaso. Para a banda 354 ocorreu fato semelhante, ela foi identificada como sendo tubulina cadeia beta com o *score* (229) bastante alto, o programa apresentou uma listagem indicando como possíveis proteínas identificadas as tubulinas cadeias beta 2A, 2B, 2C, cadeia beta 4 e 3 com os *scores* 146, 146, 142, 141 e 86. Apesar das proteínas apontadas pelo programa atenderem os critérios (*score* acima de 56, cobertura de sequência acima de 20%, número de peptídeos sobrepostos, etc) para terem as identificações positivas, somente foram consideradas neste estudo as proteínas que apresentaram o maior valor de *score* (tubulina cadeia alfa-1B e tubulina cadeia beta). O programa MASCOT, provavelmente indicou essas diferentes proteínas para cada uma das bandas, por causa da similaridade entre as seqüências de aminoácidos das cadeias da tubulina, o que resulta em vários peptídeos coincidentes após a digestão trípica. Para ter uma maior confiabilidade na identificação destas bandas e distinguir entre os diversos tipos de tubulina, o ideal seria obter a seqüência de aminoácidos através de espectrometria de massa em *tandem* (MS/ MS).

A tubulina cadeia alfa-1B é codificada pelo gene *TUBA1B* (*tubulin, alpha 1b*), localizado no cromossomo 12 (12q13.12), enquanto que a tubulina cadeia beta é codificada pelo gene *TUBB* (*tubulin, beta*) localizado no cromossomo 6 (6p21.33) (NCBI, 2010).

As bandas 317 e 354 apresentaram valores de MM/ pI um pouco diferentes daqueles que eram esperados, isso pode ter ocorrido devido a modificações pós-traducionais como acetilação, metilação e modificações na região C-terminal (McKEAN *et al.*, 2001).

MINAFRA *et al.* (2006) analisando linhagens celulares neoplásicas de mama encontraram três isoformas da tubulina cadeia alfa-4A e duas da tubulina cadeia beta. OU *et al.* (2008) compararam pela técnica de proteômica duas linhagens neoplásicas mamárias e uma não maligna, e amostras de tecido com carcinoma primário de mama, os autores obtiveram 12 isoformas da tubulina cadeia alfa-4A, 3 isoformas da tubulina cadeia beta-2C e 13 isoformas da tubulina cadeia beta. Estes

dados comprovam o grande número de isoformas das proteínas constituintes da superfamília das tubulinas observadas no câncer de mama.

A tubulina cadeia beta predomina na maioria dos tecidos mamários. Os níveis desta proteína tanto no tecido normal quanto tumoral não apresentam diferença significativa, portanto, não contribuem para respostas diferenciais dos tumores aos agentes anti-mitóticos. A sensibilidade inicial destas drogas pode depender dos níveis de tubulina polimerizada em tecidos normais *versus* tumorais, associado à expressão diferencial de proteínas relacionadas à microtúbulos e reguladores como a oncoproteína 18 (DOZIER *et al.*, 2003). Esta atua desestabilizando os microtúbulos e já foi encontrada super-expressa em tumores mamários altamente proliferativos e no câncer de ovário maligno (CASSIMERIS, 2002).

A actina, tanto como monômero quanto polímero, se liga a uma ampla variedade de proteínas acessórias nas células de eucariotos. Neste trabalho, foram encontradas 4 proteínas actina-ligantes: tropomiosina cadeia alfa-1 (bandas 586 e 599); tropomiosina cadeia alfa-3 (banda 617); tropomiosina cadeia alfa-4 (bandas 557 e 611) (FIGURA 09) e proteína tipo-actina 3 (banda 406).

As tropomiosinas são importantes proteínas associadas à estabilização dos filamentos de actina no citoesqueleto. Sua estrutura é composta de heterodímeros de cadeia alfa e beta. Apresentam uma grande diversidade em termos de tamanho, afinidade de ligação à actina, localização celular e interações com outras proteínas. (BHARADWAJ e PRASAD, 2002).

A tropomiosina cadeia alfa-1 é codificada pelo gene *TPM1* (*tropomyosin 1/alpha*), localizado no cromossomo 15 (15q22.1); a tropomiosina cadeia alfa-3 é codificada pelo gene *TPM3* (*tropomyosin 3*), localizado no cromossomo 1 (1q21.2), enquanto a tropomiosina cadeia alfa-4 é codificada pelo gene *TPM4* (*tropomyosin 4*), localizado no cromossomo 19 (19p13.1) (NCBI, 2010). De acordo com o banco de dados *UniProtKB/ Swiss-Prot*, isoformas, originadas por *splicing* alternativo, destas três cadeias da tropomiosina já foram relatadas.

A identificação da banda 557 como tropomiosina cadeia alfa-4 foi considerada duvidosa, pois apresentou uma variação no valor de massa molecular observada (39 kDa) comparado com o valor esperado (28,6 kDa), além da cobertura de sequência ter ficado abaixo dos 20%. Esta proteína atendeu aos critérios de *pl*, número de peptídeos sobrepostos e o *score*, entretanto este valor foi baixo (59), muito próximo do limite (56) da identificação ser confiável. O ideal neste caso seria realizar a

purificação peptídica ou a espectrometria de massa em *tandem* (MS/ MS) para comprovar a identificação desta banda.

Para a banda 611, observou-se que os valores de MM/ pI observados (33 kDa/ 4,71) estavam muito próximos aos valores esperados (32,7 kDa/ 4,69) da isoforma-2, relatados no banco de dados, evidência de que esta banda corresponde a isoforma-2 da tropomiosina cadeia alfa-4.

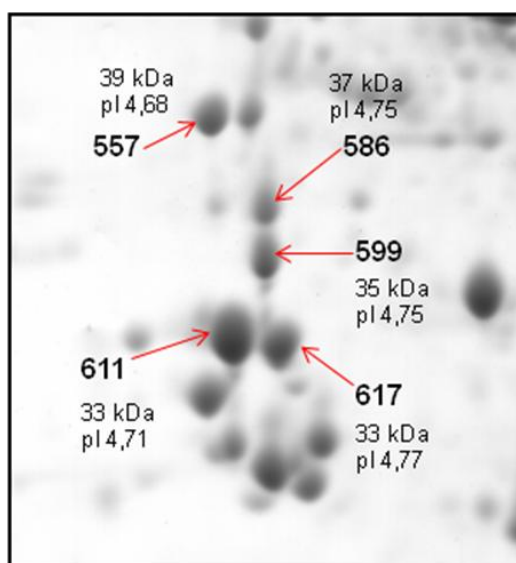


FIGURA 09 – DETALHE DAS BANDAS DAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA DAS TROPOMIOSINAS

FONTE: O autor (2010)

As setas indicam as isoformas da proteína tropomiosina cadeia alfa-1 (bandas 586 e 599), cadeia alfa-4 (bandas 557 e 611) e a tropomiosina cadeia alfa-3 (banda 617), com seus respectivos valores de massa molecular (em quilodalton) e ponto isoelétrico.

MINAFRA *et al.* (2006) analisando linhagens celulares neoplásicas de mama observaram duas isoformas da tropomiosina cadeia beta, uma banda para tropomiosina cadeia alfa-3 e duas isoformas da tropomiosina cadeia alfa-4, estas duas últimas proteínas apresentaram valores de MM/ pI bem próximos aos relatados para as bandas 617 e 611 neste estudo.

Uma caracterização mais precisa das diferenças de polipeptídeos publicada no início dos anos 90, demonstrou uma diminuição de expressão na tropomiosina 1, 2 e 3 em carcinoma mamário, sugerindo que tais anormalidades podem desempenhar um importante papel no câncer de mama (HONDERMARCK, 2003).

FRANZÉN *et al.* (1996) analisando a expressão de polipeptídeos em lesões de mama malignas e benignas observaram uma diminuição da expressão das

tropomiosinas 1, 2 e 3; e demonstraram que estas alterações de expressão contribuem para a transformação morfológica em sistemas experimentais.

A ausência de tropomiosina na formação de microfilamentos de actina tem sido proposta como base para a desorganização observada nestes elementos do citoesqueleto em células transformadas por oncogenes retrovirais. Tem sido sugerido que o desarranjo do citoesqueleto, quase sempre presente nas células neoplásicas, pode desempenhar um papel crucial na oncogênese (BHATTACHARYA *et al.*, 1990).

Outra proteína actina-ligante identificada foi a proteína tipo-actina 3 (Arp3), codificada pelo gene *ACTR3* (*ARP3 actin-related protein 3 homolog*), localizado no cromossomo 2 (2q14.1) (NCBI, 2010). Juntamente com a Arp2 e outras cinco subunidades, elas formam o complexo Arp2/3, um regulador chave da nucleação de filamentos de actina, que é conservado desde leveduras até os humanos (URUNO *et al.*, 2001). A ativação deste complexo é fundamental para a formação de uma rede de filamentos de actina (GALLETTA *et al.*, 2008).

Em 2002, WULFKUHLE *et al.* identificaram esta mesma proteína em tecido mamário com carcinoma ductal *in situ*. Observaram que a proteína Arp3 estava 3,3 vezes mais expressa no tecido tumoral do que no mamário normal.

A proteína inibidora de dissociação Rho GDP 1 (RhoGDI) é codificada pelo gene *ARHGDI1* (*Rho GDP dissociation inhibitor/ alpha*), localizado no cromossomo 17 (17q25.3) (NCBI, 2010). Pertence à família das GDIs e possui um importante papel no crescimento celular normal. É uma proteína regulatória que atua primariamente controlando a distribuição e atividade das Rho-GTPases. A sinalização aberrante destas moléculas é comumente encontrada em uma alta porcentagem de cânceres humanos, e tem sido envolvida em praticamente todos os aspectos do fenótipo maligno: aumento da proliferação de células tumorais, promoção da angiogênese e aquisição de atividades metastáticas e invasivas (ZHANG, 2006). A maioria das Rho GTPases alterna entre a forma ativa (GTP-ligado) e inativa (GDP-ligado) e este ciclo é regulado pelas GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) e GAPs (*GTPase activating proteins*), além das GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*) (HEASMAN e RIDLEY, 2008).

A super expressão de RhoGDI em várias linhagens celulares induz o desligamento das actinas do citoesqueleto e a perda da aderência ao substrato. É super expressa em diversos tipos de cânceres humanos, incluindo amostras de

tecidos mamários tumorais. Também foram observados altos níveis de expressão da RhoGDI em linhagens celulares quimioresistentes, sugerindo que esta proteína desempenhe um papel no desenvolvimento de novas drogas; outra função relacionada seria a de proteger as células cancerosas contra apoptose induzidas por diferentes agentes quimioterápicos (ZHANG *et al.*, 2005).

Neste trabalho a RhoGDI foi identificada na banda 669, que apresentou uma pequena variação de massa molecular entre os valores observados (29 kDa) e os esperados (23,2 kDa); todos os outros critérios foram atendidos plenamente. MALORNI *et al.* (2006) analisando pela técnica de proteômica linhagens celulares de câncer de mama expostas a estradiol observaram uma banda para esta mesma proteína com valores de MM/ pI similares aos relatados neste estudo.

A maioria destas proteínas, as quais desempenham funções regulatórias sobre o citoesqueleto, estão envolvidas em muitos processos celulares e a expressão diferencial entre células normais e tumorais da mama tem sido demonstrada (MINAFRA *et al.*, 2006).

7.5.2 Chaperonas moleculares/ proteínas *heat shock*

As proteínas da classe **Chaperonas moleculares/ proteínas *heat shock*** foram uma das mais frequentes neste trabalho. Diversos estudos têm demonstrado que a resposta ao choque térmico (*heat shock*) é um mecanismo de defesa altamente conservado das células contra as condições de estresse ambiental, como o calor e choque oxidativo além de condições patológicas diversas, incluindo o câncer. A consequência dos danos provocados pelo estresse é a expressão induzida de proteínas *heat shock*, das quais as chaperonas moleculares representam um importante grupo. Estas chaperonas têm a capacidade de interagir com outras proteínas para auxiliar no enovelamento, reparo ou na degradação se deformadas ou danificadas em decorrência de lesões devido ao estresse. Portanto, acabam funcionando como co-reguladoras do ciclo celular e da homeostase de proteínas (MINAFRA *et al.*, 2006).

Diversos membros dessa categoria foram encontrados super expressos em muitos tipos de tumores, sendo propostos como marcadores confiáveis para células tumorais e como possíveis alvo para a terapia (HELMBRECHT *et al.*, 2000).

Nessa categoria 7 bandas foram detectadas, correspondendo a 6 proteínas diferentes: **proteína *heat shock* beta-1** ou **Hsp27** (duas isoformas); **proteína dissulfeto-isomerase**; **proteína dissulfeto-isomerase A3**; **proteína dissulfeto-isomerase A6**; **calreticulina** e **proteína 1 complexo-T subunidade épsilon**.

As proteínas *heat shock* (*Hsp*) foram classificadas em seis grandes famílias de acordo com seu tamanho molecular: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, e proteínas *heat shock* pequenas. Dentro de cada família, os diversos genes são constitutivamente expressos, regulados, e dirigidos a diferentes compartimentos celulares (JOLLY e MORIMOTO, 2000). As proteínas *heat shock* pequenas são consideradas protetoras do tumor através de vários mecanismos independentes, como: estresse oxidativo, prevenindo a desnaturação de proteínas, atividade anti-apoptótica e provável supressão do sistema imune (LAUDANSKI e WYCZECHOWSKA, 2006).

Os níveis das proteínas *heat shock* são elevados em muitos cânceres, e a sua super expressão é um sinal de pior prognóstico em termos de sobrevida e resposta à terapia em tipos específicos de câncer. Este aumento na expressão destas proteínas nas células malignas desempenha um papel fundamental nos mecanismos de apoptose, justificando a importância das *Hsp* na progressão do tumor e resistência ao tratamento (CIOCCA e CALDERWOOD, 2005).

Foram encontradas neste estudo duas isoformas (bandas 654 e 655) da proteína *heat shock* beta-1 ou Hsp27 (FIGURA 10), que faz parte da família Hsp20. A Hsp27 é codificada pelo gene *HSPB1* (*heat shock 27kDa protein 1*), localizado no cromossomo 7 (7q11.23) (NCBI, 2010).

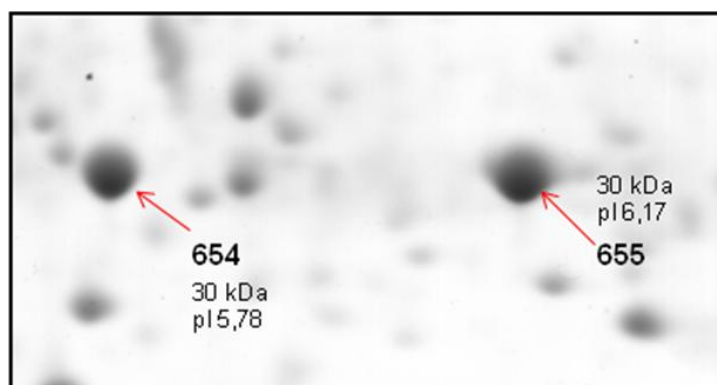


FIGURA 10 – DETALHE DAS BANDAS DA PROTEÍNA *HEAT SHOCK* BETA-1

FONTE: O autor (2010)

As setas indicam as isoformas da proteína *heat shock* beta-1 (Hsp27) (bandas 654 e 655), com seus respectivos valores de massa molecular (em quilodalton) e ponto isoelétrico.

Segundo MINAFRA *et al.* (2006) estas proteínas estão envolvidas na resistência ao estresse e na organização do citoesqueleto. Foi observado uma variação dos valores teóricos de MM/ pI (22,8 kDa/ 5,98) em relação aos obtidos neste estudo, para as bandas 654 (30 kDa/ 5,78) e 655 (30 kDa/ 6,17) (FIGURA 10). MINAFRA *et al.* (2006) analisando linhagens celulares neoplásicas de mama, também observaram duas isoformas da Hsp27, entretanto, as massas moleculares estavam mais próximas dos valores esperados, e a diferença de pI observada entre as duas isoformas foi similar a encontrada neste estudo. De acordo com a simulação realizada através do banco de dados do *PhosphoSitePlus*, com base no ponto isoelétrico, sugere-se que a banda 654 representa a isoforma da proteína com um resíduo fosforilado. Já foi relatado na literatura pontos de fosforilação na sequência desta proteína, principalmente nas serinas (posições 15, 65, 78, 82 e 199).

Um trabalho recente demonstrou um aumento de duas vezes na taxa de fosforilação da Hsp27 na posição da Serina-78, em amostras de câncer de mama HER-2 positivo em comparação com os tumores negativos para este receptor (KOSTENKO e MOENS, 2009).

HUDELIST *et al.* (2006) comparando amostras de tumores mamários e de tecido normal adjacente observaram expressão da Hsp27 em 8% (4/ 50 casos) do epitélio ductal normal, e a super expressão em 70% (35/ 50 casos) das células mamárias malignas. Através destes dados foi observado que as células do carcinoma de mama são caracterizadas por uma expressão significativamente maior de Hsp27. A expressão das *Hsp* pode inclusive ser utilizada como um marcador de prognóstico para demonstrar a agressividade do tumor. As *Hsp* participam na cascata de sinais da apoptose via caspases, e acredita-se que atuam inibindo proteínas de sinal apoptótico. Vários estudos também indicam que a Hsp27 está relacionada com a resistência à quimioterapia e um pior prognóstico.

FRANZÉN *et al.* (1996) analisaram expressão de polipeptídeos em lesões de mama malignas e benignas, a Hsp27 foi encontrada super expressa em 25% casos de carcinoma ductal, este aumento de expressão na fase inicial do câncer de mama também foi associado a um pior prognóstico.

KANG *et al.* (2008) utilizando duas linhagens celulares (uma resistente a Herceptina e outra Her-2 positiva) neoplásicas mamárias obtiveram resultados demonstrando que a super expressão de Hsp27 em células do câncer de mama pode reduzir a susceptibilidade a Herceptina, aumentando a estabilidade da proteína

Her2. Os autores sugerem que o desenvolvimento de agentes específicos para bloquear a Hsp27 pode diminuir a resistência a Herceptina e aumentar a sobrevida de pacientes com câncer de mama.

Neste trabalho, também foi encontrada as seguintes proteínas: dissulfeto-isomerase (PDI – banda 309), codificada pelo gene *P4HB* (*prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide*), localizado no cromossomo 17 (17q25); a proteína dissulfeto-isomerase A3 (PDIA3 – banda 335), codificada pelo gene *PDIA3* (*protein disulfide isomerase family A, member 3*), localizado no cromossomo 15 (15q15) e a proteína dissulfeto-isomerase A6 (PDIA6 – banda 384), codificada pelo gene *PDIA6* (*protein disulfide isomerase family A, member 6*), localizado no cromossomo 2 (2p25.1), esta última apresenta duas isoformas resultantes de *splicing* alternativo (NCBI, 2010).

Todas elas apresentaram um alto valor referente ao MASCOT score, especialmente a PDI (299) e a PDIA3 (165). Para esta última foram encontrados valores de MM/ pI muito próximos aos esperados; as outras proteínas tiveram uma pequena variação referente à massa molecular. Enfatiza-se que dentre os critérios para identificação positiva, a PDI apresentou uma porcentagem de cobertura de sequência bem alta (55%) e um grande número de peptídeos foram sobrepostos (24/ 34). Com base no banco de dados *UniProtKB/ Swiss-Prot* sugere-se que a banda 384 corresponde a isoforma-2 da proteína dissulfeto-isomerase A6, pois apresentou valores de MM/ pI observados (54 kDa/ 5,19) muito próximos dos valores esperados (53,9 kDa/ 5,17) para esta isoforma.

MINAFRA *et al.* (2006) analisando linhagens celulares neoplásicas de mama observaram uma forma da proteína dissulfeto isomerase e duas isoformas da proteína dissulfeto isomerase A3, com valores de MM/ pI similares aos obtidos neste estudo. ALLDRIDGE *et al.* (2008) analisando perfis proteômicos de duas amostras de tecido mamário tumoral e de tecido normal adjacente observaram que a PDIA3 e a PDIA6 estão super expressas no carcinoma mamário.

A enzima PDI possui multidomínio e é membro multifuncional da superfamília tioredoxina, expressa na maioria dos tecidos e órgãos é uma das proteínas mais abundantes no retículo endoplasmático. Ela pode tanto introduzir (atividade oxidase) quanto catalisar o rearranjo incorreto das pontes dissulfeto nas proteínas (atividade isomerase) (WILKINSON e GILBERT, 2004). Outra atividade que ela apresenta é de ligar-se a cadeias de polipeptídeos, atuando como uma chaperona molecular auxiliando o enovelamento dos polipeptídeos. Uma associação transitória da PDI

com polipeptídeos durante o seu enovelamento impede que as interações não-produtivas ocorram, aumentando assim a taxa de proteínas com suas estruturas corretas (LUMB e BULLEID, 2002).

Outra proteína identificada pertencente a esta classe foi a calreticulina (banda 248), codificada pelo gene *CALR* (*calreticulin*), localizado no cromossomo 19 (19p13.3-p13.2) (NCBI, 2010). Dentre todas as proteínas identificadas foi a que apresentou a maior variação de massa, comparando o valor observado (69 kDa) com o que era esperado (48,2 kDa). Entretanto, como estava de acordo com os outros critérios (MASCOT score, número de peptídeos sobrepostos, cobertura de sequência e pI), a identificação foi considerada como positiva. MINAFRA *et al.* (2006) trabalhando com linhagens celulares neoplásicas de mama, também observaram somente uma banda para a calreticulina, que apresentou uma variação de massa molecular (59,3 kDa) não tão grande quanto a obtida neste estudo, mas que também diferiu do valor esperado. Uma possível explicação poderia ser um *splicing* alternativo ou diferencial, gerando um mRNA que codifica uma proteína com uma sequência maior de aminoácidos.

MALORNI *et al.* (2006) analisando pela técnica de proteômica linhagens celulares de câncer de mama expostas a estradiol, obtiveram duas isoformas correspondentes a calreticulina que também apresentaram uma variação na massa observada (59,5 kDa) em relação ao valor esperado (48,2 kDa). SELICHAROVÁ *et al.* (2007) compararam uma linhagem derivada de células progenitoras do câncer de mama e outra de epitélio mamário normal, e detectaram a calreticulina com uma massa molecular alta (62 kDa) comparada com o valor teórico; para esta proteína não houve diferença significativa de expressão entre as duas linhagens celulares.

A calreticulina está envolvida em muitas funções celulares, tanto no lúmen do retículo endoplasmático (RE) quanto do lado de fora do RE. No lúmen, a proteína desempenha duas funções principais: atuando como chaperona e na regulação da homeostase do cálcio (Ca^{2+}). A calreticulina é uma chaperona altamente versátil, e participa na síntese de várias moléculas, incluindo canais iônicos, receptores de superfície, integrinas e de transporte. A proteína também atua na homeostase do Ca^{2+} intracelular pela modulação no transporte e armazenamento no retículo endoplasmático (MICHALAK *et al.*, 1999).

De acordo com MALORNI *et al.*, 2006 a calreticulina tem sido implicada em alguns tipos de câncer, e pode ser um excelente marcador tumoral do câncer de

próstata e de bexiga. Devido a um aumento dos níveis desta proteína em tecidos tumorais e na urina de pacientes com estas malignidades. FRANZÉN *et al.* (1996) analisando expressão de polipeptídeos em lesões de mama malignas e benignas observaram um aumento moderado da concentração de calreticulina (1,7 vezes) nas lesões malignas.

A última proteína identificada nesse grupo foi a proteína 1 complexo-T subunidade épsilon (banda 304), codificada pelo gene *CCT5 (chaperonin containing TCP1, subunit 5/ epsilon)*, localizado no cromossomo 5 (5p15.2) (NCBI, 2010). Dentre os critérios para identificação positiva, esta proteína apresentou uma porcentagem de cobertura de sequência (50%) e um MASCOT score bem altos (195), e um grande número de peptídeos foram sobrepostos (30/ 53).

Ao contrário de todas as chaperonas caracterizadas até o momento, este complexo parece estar envolvido no auxílio do enovelamento de apenas um pequeno conjunto de proteínas. Embora seja constituído como as outras chaperonas por dois anéis sobrepostos, cada anel é constituído por oito diferentes subunidades homólogas (alfa, beta, gama, delta, épsilon, zeta, eta e teta) que apresentam 30% de homologia (VALPUESTA *et al.*, 2002).

MALORNI *et al.* (2006) analisando por proteômica linhagens celulares de câncer de mama expostas a estradiol, relataram somente a subunidade beta, enquanto que MINAFRA *et al.* (2006) observaram em linhagens celulares neoplásicas de mama somente a subunidade zeta. Ressalta-se que as subunidades são encontradas em locais diferentes no gel bidimensional, variando tanto o pI quanto a massa molecular.

7.5.3 Proteínas membrana-associadas com múltiplas atividades

Outras proteínas identificadas são da classe **Proteínas membrana-associadas com múltiplas atividades**. Esta categoria funcional foi criada considerando o interesse crescente por proteínas que desempenham suas funções em associação com o plasma e/ ou membranas internas. Uma das proteínas mais representativas desta classe são as anexinas. Neste trabalho duas proteínas dessa categoria foram identificadas: **anexina A4** e **anexina A5**.

As anexinas são uma família de proteínas que se ligam ao cálcio e aos fosfolipídios, e que se associam reversivelmente com membranas. Além disso, as

anexinas têm demonstrado um envolvimento na interação do citoesqueleto, na inibição da fosfolipase, sinalização intracelular e anticoagulação. Todos os membros conhecidos são estruturalmente relacionados e apresentam um domínio conservado, que atualmente é considerado uma estrutura geral de ligação a membrana. Diversos membros desta família vêm sendo relacionados à progressão do câncer (GERKE e MOSS, 2002).

Embora no grupo das anexinas os peptídeos sinais hidrofóbicos estejam ausentes, a secreção e expressão de alguns membros desta família na superfície celular têm sido descrita em diversos tipos celulares. Nestes casos, demonstrou-se que algumas anexinas funcionam como receptores para proteínas extracelulares (MINAFRA *et al.*, 2006).

Neste trabalho foi detectada somente uma banda correspondente a cada uma das anexinas encontradas. A anexina A4 (banda 608), codificada pelo gene *ANXA4* (*annexin A4*), localizado no cromossomo 2 (2p13.3) (NCBI, 2010) apresentou os valores observados de MM/ pI (34 kDa/ 5,96) muito próximos dos que eram esperados (36,1 kDa/ 5,84). A anexina A5 (banda 605) codificada pelo gene *ANXA5* (*annexin A5*), localizado no cromossomo 4 (4q27) (NCBI, 2010) exibiu a mesma massa molecular da anterior, só variando o pI (34 kDa/ 5,04), condizente com o que é teoricamente observado (36 kDa/ 4,94).

MINAFRA *et al.* (2006) analisando linhagens celulares neoplásicas de mama obtiveram duas isoformas da anexina A1, da anexina A2 e da anexina A4, e detectaram duas formas curtas da anexina A1 e uma forma curta da anexina A2. Em um estudo de FRANZÉN *et al.* (1996) que analisaram a expressão de polipeptídeos em lesões de mama malignas e benignas observaram também uma forma da anexina A5, entretanto esta não apresentou diferença de expressão entre os dois grupos analisados.

LUO *et al.* (2005) comparando tecido mamário normal e tecido com carcinoma ductal invasor, não encontraram diferenças de expressão da anexina A5 entre os dois tecidos.

O advento da análise de expressão gênica utilizando a proteômica e metodologias envolvendo *chips* de DNA revelou mudanças na expressão do gene da anexina em vários tipos de câncer e outras doenças. Correlações desse tipo são importantes e sugerem que mudanças nos níveis de expressão de certas anexinas podem influenciar padrões de comportamento celular, como motilidade, invasão e

taxa de proliferação celular, sem dar início ao processo de transformação. Assim, as anexinas podem apresentar um potencial terapêutico no tratamento de doenças malignas (GERKE e MOSS, 2002).

SELICHAROVÁ *et al.* (2007) compararam uma linhagem derivada de células progenitoras do câncer de mama e outra de epitélio mamário normal, e observaram duas isoformas da anexina A5, sendo que para uma destas foi relatado aumento de expressão na linhagem neoplásica em relação às células normais. Em 2002, WULFKUHLE *et al.* identificaram esta mesma proteína em tecido mamário com carcinoma ductal *in situ*, e observaram que a proteína anexina A5 estava 5,8 vezes mais expressa no tecido tumoral do que no mamário normal.

CHUTHAPISITH *et al.* (2007) trabalhando com linhagens neoplásicas mamárias quimioresistentes observaram que as anexinas A1, A2 e A5 estão super expressas em células resistentes a *adriamycin*, droga comumente utilizada contra o câncer. O mecanismo pelo qual as anexinas conferem resistência a drogas não é conhecido, mas pode estar envolvido no efluxo destas proteínas através da exocitose de vesículas.

7.5.4 Biossíntese de proteínas

Na classe **Biossíntese de proteínas** foi identificada a **proteína ribossomal 40S**, que de acordo com o banco de dados do NCBI (2010) é codificada pelo gene *RPSA (ribosomal protein SA)*, localizado no cromossomo 3 (3p22.2). Esta proteína possui diversas denominações, entre elas, receptor de laminina 1, receptor de laminina 37/ 67 kDa e proteína p40 associada ao ribossomo. A sequência de aminoácidos é evolutivamente conservada, sugerindo uma importante função biológica da mesma (NCBI, 2010).

Evidências sugerem que esta proteína é um componente da maquinaria traducional, especificamente associada com a subunidade 40S ribossomal, sendo essencial para a síntese protéica. ARDINI *et al.* (1998) concluíram que evolutivamente as proteínas ribossomais adquiriram um duplo papel, atuando como moléculas bifuncionais em diversos processos celulares, além da síntese protéica, como replicação do DNA, controle da transcrição, transporte e transformação celular. De acordo com o NCBI (2010) esta proteína também atua como receptor de

superfície celular para laminina, desempenhando um papel na adesão celular à membrana basal e conseqüente ativação de vias de transdução de sinais.

A expressão da proteína ribossomal 40S em tumores pode estar relacionada não apenas à atividade de receptor da laminina, mas também à necessidade das células tumorais aumentarem a síntese protéica para suprirem o seu crescimento desordenado (ARDINI *et al.*, 1998).

A banda 467 correspondente a esta proteína apresentou uma variação relativamente grande da massa molecular (46 kDa) comparada com o que era esperado (32,9 kDa), enquanto que o valor referente ao ponto isoelétrico foi condizente com os dados da literatura. OU *et al.* (2008) numa análise proteômica, compararam duas linhagens malignas e uma não maligna de tumores mamários. Os autores observaram oito isoformas para a proteína ribossomal 40S com variação de massa molecular similar a obtida neste estudo.

7.5.5 Biossíntese de nucleotídeos

Na classe **Biossíntese de nucleotídeos** foi identificada a proteína **nucleotídeo difosfato quinase A** (NDKA). A banda 725 correspondente a esta proteína apresentou uma pequena alteração na massa molecular observada (22 kDa) comparada com a esperada (17,3 kDa). Isto pode ser devido a variações durante a segunda dimensão da eletroforese, por exemplo, o tempo de duração da corrida e o momento que esta foi interrompida (quando a frente de migração esta aproximadamente 1cm do limite inferior do gel). Estas variações na segunda dimensão eletroforética podem resultar em pequenas alterações na posição vertical das bandas, especialmente as que apresentam uma menor massa molecular.

FRANZÉN *et al.* (1996) analisando a expressão de polipeptídeos em lesões de mama malignas e benignas encontraram uma forma da proteína nucleotídeo difosfato quinase. Os autores observaram que os níveis da NDK têm sido baixos em células metastáticas, entretanto, um pequeno aumento destes níveis foi encontrado em carcinomas de lenta proliferação.

Uma das funções mais importantes da proteína NDK é o fornecimento de nucleotídeos para a síntese de ácidos nucléicos. Sabe-se que oito isoformas (divididas em dois grupos) da NDK estão presentes nos organismos multicelulares. Todas as isoformas do grupo I possuem atividade quinase e podem estar envolvidas

no controle da homeostase de nucleotídeos no citoplasma (NDKA, NDKB e NDKC), no núcleo (NDKB) e nas mitocôndrias (NDKD). As três isoformas citoplasmáticas desempenham um papel na progressão do tumor, diferenciação e apoptose (LACOMBE *et al.*, 2000).

A NDKA é codificada pelo gene *NME1* (*non-metastatic cells 1*), localizado no cromossomo 17 (17q21.3) (NCBI, 2010). De acordo com o banco de dados *UniProtKB/ Swiss-Prot* esta proteína pode apresentar três isoformas resultantes de *splicing* alternativo.

O controle do potencial metastático envolve principalmente a NDKA. Em condições fisiológicas normais, NDKA e NDKB estão envolvidas na proliferação, desenvolvimento e diferenciação. Em linhagens celulares derivadas do câncer de mama, ambas as proteínas estão localizadas principalmente no citoplasma, particularmente na periferia do núcleo, e estão em parte associadas com a rede de microtúbulos das células interfásicas (LACOMBE *et al.*, 2000).

Sabe-se que há expressão reduzida de NDK em alguns carcinomas de ovário e de mama agressivos, além de melanoma e outros cânceres. HARTSOUGH e STEEG (2000) realizaram uma meta-análise e observaram que em 18 trabalhos foi obtida uma correlação estatisticamente significativa entre a diminuição da expressão da proteína nucleotídeo difosfato quinase A e o desenvolvimento de características metastáticas da doença (grau histopatológico do tumor, metástase nos linfonodos axilares, expressão de receptores hormonais).

O restabelecimento dos níveis desta proteína em células tumorais malignas reduziu significativamente sua tendência metastática. Isso ocorreu concomitantemente com a redução da motilidade celular, invasão e colonização, eventos necessários para o desenvolvimento de lesões metastáticas (HARTSOUGH e STEEG, 2000).

7.5.6 Crescimento celular e regulação da proliferação

A categoria das proteínas envolvidas no **Crescimento celular e regulação da proliferação** é composta por cinco proteínas: **14-3-3 gama** (banda 635); **14-3-3 épsilon** (banda 628); **14-3-3 teta** (banda 637); **14-3-3 zeta/ delta** (banda 645) e a **proibitina** (banda 640).

A família 14-3-3 é composta por proteínas diméricas que exibem uma notável conservação de seqüências entre as espécies; são codificadas por sete genes em mamíferos (alfa/ beta, épsilon, eta, gama, tau/ teta, zeta/ delta e sigma) e estão presentes em praticamente todos os tecidos (FU *et al.*, 2000). Com base no banco de dados do NCBI (2010), a 14-3-3 gama é codificada pelo gene *YWHAG* (*tyrosine 3-monooxygenase/ tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide*), localizado no cromossomo 7 (7q11.23); a 14-3-3 épsilon é codificada pelo gene *YWHA E* localizado no cromossomo 17 (17p13.3); a 14-3-3 teta é codificada pelo gene *YWHA Q* localizado no cromossomo 2 (2p25.1) e a 14-3-3 zeta/ delta é codificada pelo gene *YWHA Z* localizado no cromossomo 8 (8q23.1).

Uma característica deste grupo é a capacidade de se ligarem com proteínas fosforiladas nos resíduos de serina e treonina, além de moléculas sinalizadoras incluindo quinases, fosfatases, e receptores transmembrana. Esta interação com outras proteínas faz com que as 14-3-3 desempenhem um papel importante nos processos regulatórios, como transdução de sinal mitogênico, apoptose e controle do ciclo celular (FU *et al.*, 2000).

Em todos os casos, as proteínas da família 14-3-3 têm um efeito inibitório sobre a progressão do ciclo celular, mantendo, direta ou indiretamente, a ciclina-dependente de quinase Cdc2 em uma forma inativa impedindo assim a transição da fase G2-M. Este grupo de proteínas também estimula o fator de transcrição p53, resultando na inibição da transição da fase G1-S. Além disso, a ativação do p53 leva a um aumento no nível da 14-3-3 sigma, o que resulta na inibição da transição da fase G1 para a S e G2 para M (HEMERT *et al.*, 2001).

Para cada uma das proteínas desta classe, identificadas nesse trabalho, foi encontrada somente uma banda no gel, todas apresentando valores de MM/ pI muito próximos dos que eram esperados. MINAFRA *et al.* (2006) trabalhando com linhagens celulares neoplásicas de mama encontraram duas isoformas da 14-3-3 zeta/ delta, entretanto estas apresentaram uma variação de MM/ pI comparáveis com os valores teóricos. ALLDRIDGE *et al.* (2008) realizaram uma análise de perfis proteômicos de duas amostras de tecido mamário tumoral comparando com as de tecido normal adjacente e observaram que a 14-3-3 épsilon está super expressa no carcinoma mamário.

Em 2002, WULFKUHLE *et al.* identificaram a 14-3-3 zeta/ delta em tecido mamário com carcinoma ductal *in situ*. Observaram que esta proteína estava 3,7 vezes mais expressa no tecido tumoral do que no mamário normal.

A maioria dos trabalhos presentes na literatura, relacionando esta família ao câncer, envolve estudos da proteína 14-3-3 sigma. A diminuição da expressão desta proteína tem demonstrado ser uma modificação importante do proteoma associada à carcinogênese de células epiteliais mamárias. VERCOUTTER-EDOUART *et al.* (2000) investigaram a sua distribuição em biópsias de câncer de mama e verificaram que a expressão da 14-3-3 sigma é menor em amostras de tumores.

FERGUSSON *et al.* (2000) analisando níveis de mRNA, demonstraram que a expressão de 14-3-3 sigma é diminuída em células do câncer de mama devido à alta frequência de hipermetilação do *locus* desta proteína. Do ponto de vista clínico, tem sido relatado que a diminuição da expressão do gene da 14-3-3 sigma é um evento inicial na carcinogênese mamária e que contribui para a resistência às drogas (LIU *et al.*, 2006).

Outra proteína identificada dentro dessa classe foi a proibitina, que de acordo com o banco de dados do NCBI (2010) é codificada pelo gene *PHB* (*prohibitin*), localizado no cromossomo 17 (17q21). Este gene é considerado como regulador negativo da proliferação celular.

Em dois trabalhos de análise proteômica, MINAFRA *et al.* (2006) com linhagens celulares neoplásicas de mama e MALORNI *et al.* (2006) com linhagens celulares de câncer de mama expostas a estradiol, observaram a mesma proteína com valores de MM/ pI semelhantes aos obtidos neste estudo.

SATO *et al.* (1993) analisando alterações em um grande número de tumores humanos observaram que mutações somáticas no gene da proibitina estão associadas com o desenvolvimento e/ ou progressão de uma pequena porcentagem dos cânceres de mama esporádicos. Os autores concluíram que este gene pode atuar como supressor de tumor.

A proibitina exerce uma atividade antiproliferativa inibindo a transição das fases do ciclo celular e a síntese de DNA em fibroblastos e em linhagens de células de mama imortalizadas. Estas características específicas sugerem que a diminuição da expressão da proibitina ou a perda da sua atividade funcional podem causar alterações significativas no crescimento celular (JUPE *et al.*, 1996).

7.5.7 Degradação protéica

A degradação protéica é um processo importante para manter a homeostase no interior da célula (MINAFRA *et al.*, 2006). Foram identificadas duas proteínas que fazem parte desta categoria: o **complexo ativador do proteassoma subunidade 1**, que de acordo com o banco de dados do NCBI (2010) é codificado pelo gene *PSME1* (*proteasome activator subunit 1 – PA28 alpha*), localizado no cromossomo 14 (14q11.2) e o **complexo ativador do proteassoma subunidade 2** codificado pelo gene *PSME2* (*proteasome activator subunit 2 – PA28 beta*), localizado na mesma região cromossômica da subunidade 1.

O proteassoma é um complexo enzimático multi-catalítico encontrado no núcleo e no citoplasma de todas as células eucarióticas, envolvido na proteólise intracelular (RICHARDSON *et al.*, 2005). É constituído por uma estrutura catalítica central denominada 20S, presa nas suas duas extremidades laterais a complexos regulatórios 19S, em alguns casos (imunoproteassoma) esta estrutura regulatória é substituída por uma denominada 11S ou PA28. As duas proteínas desta categoria constituem este complexo regulatório (NCBI, 2010).

O proteassoma é altamente seletivo com ações que garantem uma degradação rápida das proteínas-alvo. O mecanismo mais comum para o reconhecimento de uma proteína para a degradação envolve a ligação das cadeias de ubiquitina (proteína de 76 aminoácidos). Além de regular a homeostase de proteínas, a via proteassoma-ubiquitina é um mecanismo importante para a regulação do ciclo e da resposta celular a estímulos pró-apoptóticos. Substratos para a degradação pelo proteassoma incluem moléculas de sinalização, supressores de tumor, reguladores do ciclo celular, fatores de transcrição, moléculas inibidoras, e proteínas anti-apoptóticas (RICHARDSON *et al.*, 2005).

A subunidade 1 (PA28alfa) encontrada neste trabalho, é uma ativadora do sistema imunoproteassoma e tem um papel fundamental no controle da resposta imune. A PA28alfa aumenta a geração de peptídeos de classe I pela alteração dos padrões de clivagem do proteassoma que é necessário para um eficiente processamento do antígeno (ZHANG *et al.*, 2007).

Muitos trabalhos descritos na literatura envolvem a pesquisa de inibidores do proteassoma, que podem suspender ou retardar a progressão do câncer interferindo na degradação das proteínas do ciclo celular. A inibição das funções deste complexo

resulta na apoptose. Estudos pré-clínicos demonstraram uma sensibilidade diferencial das células neoplásicas à inibição do proteassoma, sugerindo um potencial alvo no desenvolvimento de novas drogas contra o câncer (ADAMS, 2003).

ZHANG *et al.* (2007) realizaram uma análise proteômica diferencial entre amostras de carcinoma hepatocelular e tecido normal adjacente e observaram que os níveis de expressão da PA28alfa foram três vezes menores nos tumores do que nos tecidos não tumorais.

7.5.8 Detoxificação e proteínas redox

Proteínas redox são enzimas que desempenham um importante papel no catabolismo celular e proteção contra o estresse metabólico. Diversos experimentos têm sugerido que o estresse oxidativo está relacionado com várias respostas celulares, e que, por sua vez o controle da redução/ oxidação (redox) é fundamental na manutenção da homeostase de todo o organismo (MINAFRA *et al.*, 2006).

As proteínas da classe de **detoxificação e proteínas redox** foram uma das mais perceptíveis encontradas neste trabalho. Foram identificadas cinco proteínas: **glutathione S-transferase P** (banda 693); **peroxiredoxina 2** (banda 707); **peroxiredoxina 6** (banda 668); **proteína DJ-1** (banda 695) e a **superóxido dismutase (Cu/Zn)** (banda 734).

Entre essas enzimas, os sistemas da tiorredoxina (Trx) e da transferase são provavelmente os mais estudados e são considerados os principais sistemas redox em células animais (MINAFRA *et al.*, 2006). As glutathione S-transferases (*GSTs*) são uma família de enzimas que desempenham um importante papel na detoxificação, por catalisar a conjugação de muitos compostos hidrofóbicos e eletrofílicos através da glutathione reduzida, resultando na neutralização de substâncias tóxicas. Com base em suas propriedades bioquímicas, imunológicas e estruturais, as *GSTs* solúveis são classificadas em quatro classes principais: alfa, mu, pi e teta (KANO *et al.*, 1987).

Uma das proteínas identificadas nesta categoria foi a glutathione S-transferase P, codificada pelo gene *GSTP1* (*glutathione S-transferase pi 1*), localizado no cromossomo 11 (11q13). É encontrada nas células na forma de homodímeros e uma de suas principais funções é o metabolismo de xenobióticos, desempenhando um papel na susceptibilidade ao câncer e outras doenças (NCBI, 2010).

FRANZÉN *et al.* (1996) analisaram a expressão de polipeptídeos em lesões de mama malignas e benignas e também encontraram a glutathione S-transferase P. Os níveis desta proteína estavam um pouco menores nas células malignas do que nos fibroadenomas, embora essa diferença não fosse estatisticamente significativa. MINAFRA *et al.* (2006) trabalhando com linhagens celulares neoplásicas de mama também identificaram esta mesma proteína.

SELICHAROVÁ *et al.* (2007) utilizando análise proteômica, compararam linhagens celulares progenitoras do câncer de mama e de epitélio mamário normal. Os autores encontraram duas isoformas desta mesma proteína, entretanto estas não apresentaram diferença de expressão entre as duas linhagens celulares.

OU *et al.* (2008) realizando análise proteômica comparativa de duas linhagens neoplásicas mamárias, uma linhagem não maligna e amostras de carcinoma primário de mama observaram oito isoformas da glutathione S-transferase P. Todas elas apresentaram uma grande variação de MM/ pI comparado com os valores teóricos.

Na última década, o sistema da peroxiredoxina tem recebido muita atenção por sua eficiência antioxidante. A família Prx em mamíferos é composta de seis proteínas localizadas no citoplasma e em vários outros locais no interior da célula, incluindo peroxissomos e mitocôndrias (onde o estresse oxidativo é mais evidente). Alguns dos membros da Prx também têm efeitos sobre a diferenciação celular e apoptose e foram encontrados super expressos no câncer de mama (KARIHTALA *et al.*, 2003).

Na família Prx foram identificadas duas proteínas, a peroxiredoxina 2 codificada pelo gene *PRDX2* (*peroxiredoxin 2*), localizado no cromossomo 19 (19p13.2) e a peroxiredoxina 6 codificada pelo gene *PRDX6* (*peroxiredoxin 6*), localizado no cromossomo 1 (1q25.1) (NCBI, 2010). Esta proteína tem apenas uma cisteína conservada e é o único membro do subgrupo 1-Cys, encontrado em maiores concentrações no pulmão. A peroxiredoxina 2 possui duas cisteínas conservadas e pertencem ao subgrupo 2-Cys e quando oxidada as duas cisteínas reagem formando uma ponte dissulfeto intermolecular (KARIHTALA *et al.*, 2003).

A banda 668 correspondente a peroxiredoxina 6 apresentou uma variação grande do ponto isoelétrico observado (6,67) comparado com o teórico (6,0). Juntamente com a haptoglobina, sendo as únicas proteínas que apresentaram esta variação maior que 0,6. Trabalhos descritos na literatura já relataram a ocorrência de

fosforilações na estrutura da peroxiredoxina 6, o que não justifica o aumento de 0,6 unidades no valor de pl.

O estresse oxidativo é importante não só para a fisiologia celular normal, mas também para muitos processos patológicos como aterosclerose, doenças neurodegenerativas e câncer. Espécies reativas a oxigênio (ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio) participam em todos os estágios da carcinogênese como, por exemplo, iniciação, promoção e progressão tumoral (KLAUNIG *et al.*, 1998). WRIGHT *et al.* (1998) descreveram que a adição do radical hidroxila no DNA de células do câncer de mama foi elevada entre 8 e 17 vezes em relação ao DNA de células do tecido normal. Os autores observaram que modificações no material genético induzidas pela ação do radical hidroxila têm sido diretamente relacionadas com a progressão do câncer de mama, fornecendo informações sobre um melhor prognóstico da doença.

KARIHTALA *et al.* (2003) analisaram, através de imunohistoquímica, amostras de 600 pacientes com carcinoma mamário. Observaram que houve expressão das peroxiredoxinas 1, 3, 4 e 5 em mais de 80% dos casos, enquanto que a expressão das Prx 2 (59% dos casos) e Prx 6 (52,6%) foi menos frequente. NOH *et al.* (2001) analisaram, através da técnica de *western-blotting*, 24 amostras de tecido mamário tumoral e normal adjacente, e encontraram super expressão da Prx 2 no tecido tumoral de 18 pacientes (75%). Os autores sugeriram que os níveis elevados de Prx no câncer podem ser decorrentes de funções proliferativas e antiapoptóticas que podem influenciar a tumorigênese.

ALLDRIDGE *et al.* (2008) realizaram uma análise proteômica comparativa entre de tecido mamário tumoral e tecido normal adjacente, e observaram que houve uma super expressão das peroxiredoxinas 1 e 6 no carcinoma mamário.

Outra proteína identificada nesta categoria foi a DJ-1, segundo o NCBI (2010) é codificada pelo gene *PARK7* (*Parkinson disease 7*), localizado no cromossomo 1 (1p36.23). De acordo com ZHANG *et al.* (2007) a localização do gene que codifica a DJ-1 está associada a duas regiões cromossômicas relacionadas ao câncer: 1p36 (câncer de mama ductal e susceptibilidade ao câncer de próstata e cérebro) e 1p36.11(câncer de fígado).

DJ-1 é uma proteína de 20 kDa, cuja seqüência é conservada nas células procarióticas e eucarióticas. Em algumas células estão associadas com as mitocôndrias, principalmente após o estresse oxidativo. O exato papel desta proteína

não é muito claro, mas diversas funções celulares vêm sendo atribuídas a ela. A DJ-1 foi originalmente relatada como um pró-oncogene, especialmente co-expresso com outros oncogenes como *c-MYC* ou *c-RAS*. HOD (2004) identificou a DJ-1 (formalmente denominada de RS) como uma proteína que regula a interação RNA-proteína através da fosforilação do cAMP, e atua na resposta ao estresse oxidativo no controle da infertilidade masculina, entre outros. Mutações no gene que codifica esta proteína demonstraram associação com a forma autossômica recessiva da doença de Parkinson.

A proteína DJ-1 também é considerada como reguladora negativa do supressor de tumor *PTEN*. KIN *et al.* (2005) observaram a expressão da DJ-1 no citoplasma de células de câncer de mama invasivo, enquanto não havia expressão do *PTEN*. Os autores sugeriram um mecanismo pelo qual a DJ-1 desempenhe um papel na tumorigênese nos casos em que mutações no *PTEN* não são frequentes, como nos carcinomas primários de mama.

LE NAOUR *et al.* (2001) empregando perfis proteômicos, obtiveram uma diminuição da expressão citoplasmática da DJ-1 em células tumorais mamárias. Entretanto, os autores encontraram níveis elevados desta proteína no sangue periférico de 37% dos pacientes com câncer de mama em relação a indivíduos saudáveis. Esta diferença de concentração sugere uma migração da DJ-1 do ambiente intra para o extracelular durante o desenvolvimento do tumor, sugerindo que esta proteína pode ser utilizada como marcador protéico.

ZHANG *et al.* (2007) realizaram uma análise proteômica diferencial entre amostras de carcinoma hepatocelular e tecido normal adjacente, e observaram uma diminuição da expressão da DJ-1 no tecido tumoral, que pode indicar um estado fisiopatológico anormal da mitocôndria, influenciando na tumorigênese.

A última proteína identificada neste grupo foi a superóxido dismutase (Cu/Zn), codificada pelo gene *SOD1* (*superoxide dismutase 1*) localizado no cromossomo 21 (21q22.1) (NCBI, 2010). A banda correspondente a esta proteína foi a única das 57 identificadas que apresentou o *score* (47) abaixo do valor mínimo (56), a partir do qual a identificação deixa de ser considerada aleatória. Somente três peptídeos (de um total de 20) foram pareados com base na clivagem *in silico* realizada pelo programa MASCOT, enquanto que o mínimo proposto neste trabalho eram quatro. Apesar disto, a identificação foi considerada positiva com base em outros critérios

como, valores de MM/ pI condizentes com os esperados e cobertura de sequência acima de 20%.

A família das enzimas superóxido dismutase (SOD) tem como função converter o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Duas proteínas fazem parte desta família, a SOD Cu/Zn no citoplasma e a SOD Mn presente nas mitocôndrias (RAO *et al.*, 2008). Os efeitos do peróxido de hidrogênio no crescimento celular podem ser devido a alterações das vias de sinalização ou a danos celulares, causados principalmente pelos radicais hidroxilas formados a partir da reação do H_2O_2 com íons de ferro ou cobre. Os danos causados por esta molécula podem influenciar a capacidade mitótica da célula, causando a inibição do crescimento do tumor (WEYDERT *et al.*, 2006).

7.5.9 Proteínas com função de ligação

Proteínas da classe **com função de ligação** foram uma das mais observadas neste trabalho, sendo identificadas sete proteínas: **sorotransferrina** (banda 175 e 180); **haptoglobina** (banda 506); **cadeia gama do fibrinogênio** (banda 393); **proteína canal de cloro intracelular 1** (banda 620); **transtiretina** (banda 766); **alfa-1 antitripsina** (bandas 306 e 322) e **inibidor da ribonuclease** (banda 432).

A sorotransferrina ou transferrina foi identificada em duas isoformas no gel, codificada pelo gene *TF (transferrin)*, localizado no cromossomo 3 (3q22.1). É uma glicoproteína monomérica que transporta íons de ferro entre os locais de absorção, armazenamento e utilização. O ferro é essencial para o crescimento celular e os processos metabólicos incluindo a síntese de DNA e o transporte de oxigênio e elétrons, entretanto o ferro tem que estar ligado a proteínas para evitar danos aos tecidos pela formação de radicais livres. A sorotransferrina está envolvida no crescimento e proliferação celular, como mitógeno em leucócitos ou como fator de crescimento em algumas células tumorais (PARK *et al.*, 2009; VYHLIDAL *et al.*, 2002).

As bandas (175 e 180) (FIGURA 11) correspondentes a esta proteína apresentaram uma variação pequena de massa molecular comparada com o que era esperado, e os valores de pI observados (6,82 e 6,75) foram muito próximos do valor teórico (6,81). De acordo com a simulação realizada através do banco de dados do *PhosphoSitePlus*, com base no ponto isoelétrico, sugere-se que a banda

175 representa o estado não fosforilado da sorotransferrina, enquanto a banda 180 é a isoforma da proteína com um resíduo fosforilado.

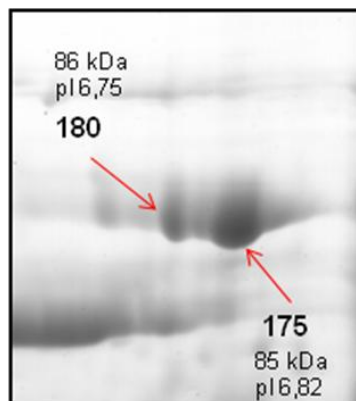


FIGURA 11 – DETALHE DAS BANDAS DA PROTEÍNA SOROTRANSFERRINA

FONTE: O autor (2010)

As setas indicam as isoformas da proteína sorotransferrina (bandas 175 e 180), com seus respectivos valores de massa molecular (em quilodalton) e ponto isoelétrico.

Segundo AGARWAL *et al.* (2000) diferentes níveis de expressão da sorotransferrina e de seu receptor em pacientes com câncer pode apresentar propriedades metastáticas, seu nível sérico ou a localização no tecido podem ser correlacionados com a proliferação celular e malignidade em células do câncer de mama. Os autores analisaram, através de imunohistoquímica, a distribuição da sorotransferrina em 153 casos (63 lesões benignas e 90 tumores malignos), observando que a presença da proteína foi muito maior nos tumores malignos (92,2%) quando comparada com as lesões mamárias benignas (28,5%) (AGARWAL *et al.*, 2000).

Outra proteína identificada nessa categoria foi a haptoglobina, que de acordo com o NCBI (2010), é codificada pelo gene *HP* (*haptoglobin*), localizado no cromossomo 16 (16q22.1). A banda correspondente a esta proteína apresentou a massa molecular observada (43 kDa) bem próxima ao que era esperada (45,9 kDa), entretanto o pI encontrado (5,34) teve uma variação relativamente grande comparado com o valor teórico (6,13). Somente a haptoglobina e a peroxiredoxina 6 (banda 668) apresentaram uma variação maior que 0,6 do ponto isoelétrico. Não foi relacionado na literatura fosforilações na haptoglobina, entretanto a variação de pI no sentido ácido sugere a ocorrência deste tipo de modificação na estrutura desta proteína.

ALLDRIDGE *et al.* (2008) realizaram uma análise de perfis proteômicos de duas amostras de tecido mamário tumoral comparadas com o tecido normal adjacente e observaram que a sorotransferrina e a haptoglobina estão super-expressa nas amostras de carcinoma mamário.

A haptoglobina (Hp) é uma glicoproteína do soro que funciona como uma proteína de fase aguda de processos infecciosos, inflamatórios, traumas, necrose tecidual, etc, que se liga com a hemoglobina livre e apresenta atividade antioxidante. A formação do complexo Hp-hemoglobina na circulação impede a perda de ferro pelos rins e previne a formação e o acúmulo de radicais livres. A haptoglobina é formada por duas cadeias alfa e duas cadeias beta que se combinam formando um tetrâmero. Esta proteína possui duas formas alélicas, Hp1 e Hp2, que resultam em três fenótipos (Hp1-1, Hp2-1 e Hp2-2), que apresentam propriedades funcionais e estruturais distintas com significância biológica e implicações clínicas, entre elas, resposta imune e processos inflamatórios (AWADALLAH *et al.*, 2004).

Nas neoplasias, incluindo o câncer de mama, a importância do aumento da expressão de haptoglobina ainda não é totalmente esclarecida. A Hp é principalmente secretada por células do fígado, bem como, por células cancerosas. Segundo HAMRITA *et al.* (2009) o aumento da síntese desta proteína pelos hepatócitos ocorre devido a uma resposta de fase aguda em pacientes com câncer de mama, resultando num aumento da concentração sérica da haptoglobina.

Níveis altos de Hp no câncer de mama podem ter efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores, inibindo a síntese de prostaglandinas, bloqueando a atividade catalítica das enzimas ciclooxigenases (SAEED *et al.*, 2007). Pode também desempenhar um importante papel na migração celular, uma vez que é uma inibidora natural da degradação do colágeno, um processo frequentemente encontrado em condições patológicas, como no câncer de mama, resultando na degradação da matriz extracelular e migração celular. A haptoglobina tem sido relatada por apresentar atividade inibitória significativa contra a catepsina B, uma protease envolvida na carcinogênese mamária (WESTERMARCK e KÄHÄRI, 1999).

A haptoglobina também favorece a resposta imune mediada por células *T-helper 1*, um mecanismo de defesa contra tumores que atua como fator determinante na resposta do indivíduo à neoplasia através da retenção de ferro livre, que está diretamente ligado ao desenvolvimento do câncer de mama por meio da produção de oxidantes (HAMRITA *et al.*, 2009).

Outra proteína identificada nessa categoria foi a cadeia gama do fibrinogênio, que de acordo com o NCBI (2010) é codificada pelo gene *FGG* (*fibrinogen gamma chain*), localizado no cromossomo 4 (4q28). A banda desta proteína apresentou a massa molecular observada (54 kDa) muito próxima da esperada (52,1 kDa), entretanto o ponto isoelétrico teve uma variação do valor observado (5,92) para o teórico (5,37). De acordo com o banco de dados *UniProtKB/ Swiss-Prot* esta proteína pode apresentar duas isoformas resultantes de *splicing* alternativo (Isoforma gama-A e B).

SOMIARI *et al.* (2003) analisando comparativamente carcinomas mamários ductais invasores e tecidos não neoplásicos, observaram uma banda correspondente a cadeia gama do fibrinogênio, cuja expressão era quatro vezes maior nos carcinomas mamários em relação ao tecido normal.

O fibrinogênio é uma glicoproteína plasmática que desempenha um importante papel na coagulação sanguínea, interações célula-matriz, resposta inflamatória, cicatrização e neoplasia. Tem sido demonstrado que o fibrinogênio induz sinais proliferativos, utilizado como uma estrutura para apoiar a ligação de fatores de crescimento e promover respostas celulares de adesão, proliferação, e migração durante a cicatrização de feridas, angiogênese e crescimento tumoral (AKAKURA *et al.*, 2006).

A estrutura do fibrinogênio consiste em dois domínios D laterais, cada um conectado por um segmento helicoidal a um domínio E central. A molécula é constituída por dois conjuntos de três cadeias polipeptídicas denominadas alfa, beta e gama, que estão unidas no domínio E na região N-terminal por cinco pontes dissulfeto simétricas (MOSESSON, 2005). O fibrinogênio pode se ligar, com alta afinidade, ao receptor de integrina nas plaquetas ativadas e também possui sítios de ligação aos íons cálcio, que são importantes para a estabilidade estrutural e funcional. Os sítios de alta afinidade pelo cálcio estão presentes na cadeia gama (WEISEL, 2005).

A proteína canal de cloro intracelular 1 também foi identificada neste trabalho. É codificada pelo gene *CLIC1* (*chloride intracellular channel 1*), localizado no cromossomo 6 (6p21.3) (NCBI, 2010). Os canais de cloro são um grupo diverso de proteínas que regulam processos celulares fundamentais incluindo, estabilização do potencial da membrana celular, transporte trans-epitelial, manutenção do pH

intracelular e regulação do volume da célula. Esta proteína é membro da família p64, podendo formar e inserir canais de íon cloreto nas membranas celulares.

Recentemente, esta proteína e outros canais de cloro intracelular têm sido relacionados na alteração do ciclo celular, apoptose e adesão celular, mas o seu papel em metástases tumorais permanece indefinido (WANG *et al.*, 2009).

Em 2002, WULFKUHLE *et al.* identificaram a proteína canal de cloro intracelular 1 num carcinoma ductal mamário *in situ*. Observaram que a proteína estava 3,3 vezes mais expressa no tecido tumoral do que no mamário normal. SELICHAROVÁ *et al.* (2007) em um trabalho de análise proteômica, compararam uma linhagem derivada de células progenitoras do câncer de mama e outra de epitélio mamário normal. Os autores encontraram duas isoformas para esta proteína, sendo que para uma delas foi observado aumento de expressão na linhagem neoplásica em relação às células normais.

Na região 18q12.1 do cromossomo 18, encontra-se o gene *TTR* (*transthyretin*), o qual codifica a proteína transtiretina (NCBI, 2010). Anteriormente ela e a alfa-1 antitripsina eram denominadas pré-albuminas. A transtiretina é uma proteína plasmática secretada principalmente pelo fígado envolvida no transporte dos hormônios da tireóide e de retinol (vitamina A) no plasma. A proteína é constituída por um tetrâmero de subunidades idênticas e mais de 80 diferentes mutações no gene *TTR* já foram relatados (INGENBLEEK e YOUNG, 1994).

ALLDRIDGE *et al.* (2008) realizaram uma análise proteômica comparativa entre duas amostras de tecido mamário tumoral e tecido normal adjacente e observaram um aumento de expressão da transtiretina nas amostras de carcinoma mamário.

A alfa-1 antitripsina, é codificada pelo gene *SERPINA1* (*serpin peptidase inhibitor, clade A, member 1*) localizado no cromossomo 14 (14q32.1). Faz parte da superfamília de proteínas relacionadas estruturalmente denominada de SERPINS (inibidores de protease serina), desempenhando um papel central na regulação de processos proteolíticos. Seu alvo principal é a elastase, mas também possui afinidade pela plasmina, trombina, tripsina e a quimiotripsina. Estudos recentes têm sugerido que a deficiência de alfa-1 antitripsina é associada com aumento do risco de diferentes tipos de câncer, a diminuição dos níveis desta proteína pode induzir atividade protease serina, aumentando assim o desprendimento de células malignas de seus locais de origem. Pode também apresentar um papel na regulação de

processos de crescimento, na inibição da apoptose e citotoxicidade dos linfócitos (HAMRITA *et al.*, 2009).

As bandas 306 e 322 correspondentes a esta proteína (FIGURA 12) apresentaram uma alteração na massa molecular observada (61 e 60 kDa respectivamente) em relação ao valor esperado (46,9 kDa). DENG *et al.* (2006) em um trabalho de análise proteômica comparativa entre tecido mamário tumoral e normal adjacente encontraram a alfa-1 antitripsina apresentando variação na massa molecular observada (58,6 kDa). Os valores de pI obtidos para esta proteína foram similares aos encontrados neste estudo.

De acordo com a simulação realizada através do banco de dados do *PhosphoSitePlus*, com base no ponto isoelétrico, sugere-se que a banda 322 representa a isoforma da alfa-1 antitripsina com quatro resíduos fosforilados, enquanto a banda 306 seria a isoforma da proteína com cinco resíduos fosforilados.

Para a banda 322 o programa MASCOT apresentou uma listagem de proteínas e indicou além da alfa-1 antitripsina as tubulinas cadeias alfa 1C, 1A e 1B, com o *score* (58) acima do valor mínimo (56) para que a identificação não seja considerada aleatória. Apesar das proteínas apontadas pelo programa apresentarem todos os critérios (*score*, cobertura de sequência acima de 20%, número de peptídeos sobrepostos) para terem as identificações confiáveis, somente foi considerada a proteína que apresentou o maior valor do *score*, no caso, a alfa-1 antitripsina.

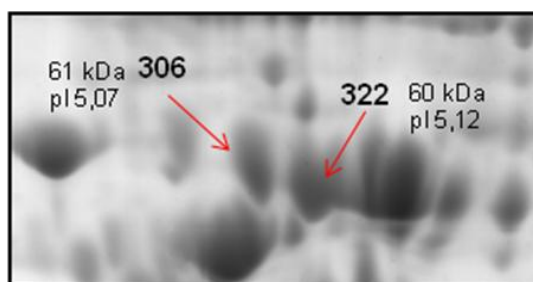


FIGURA 12 – DETALHE DAS BANDAS DA PROTEÍNA ALFA-1 ANTITRIPSINA

FONTE: O autor (2010)

As setas indicam as isoformas da proteína alfa-1 antitripsina (bandas 306 e 322), com seus respectivos valores de massa molecular (em quilodalton) e ponto isoelétrico.

SOMIARI *et al.* (2003) analisando comparativamente carcinomas mamários ductais invasores e tecidos não neoplásicos, obtiveram seis isoformas da alfa-1 antitripsina, observaram que todas elas apresentaram uma diminuição de expressão

nos carcinomas mamários em relação ao tecido normal. Os autores sugeriram que as isoformas encontradas são devido a modificações pós-traducionais (glicosilações e fosforilações) que modificam a localização das bandas no gel.

Em outro trabalho, DENG *et al.* (2006) também realizando uma análise proteômica comparativa entre carcinomas mamários ductais e tecidos normais adjacentes, obtiveram uma forma da mesma proteína que foi sub-expressa nos tecidos tumorais.

A proteína inibidora de ribonuclease (IR) é codificada pelo gene *RNH1* (*ribonuclease/ angiogenin inhibitor 1*), localizado no cromossomo 11 (11p15.5). A IR é uma proteína citosólica de aproximadamente 50 kDa que se liga a ribonucleases pancreáticas tornando-as inativas. Os complexos formados entre a IR e as ribonucleases estão entre as interações biomoleculares mais estáveis. A estrutura tridimensional da IR é igualmente notável, sendo caracterizada pela alternância entre as unidades da alfa-hélice e folha beta-pregueada resultando numa forma de ferradura. As unidades estruturais de repetição da proteína inibidora de ribonuclease possuem uma sequência rica em resíduos de leucina (DICKSON *et al.*, 2005).

O papel biológico da IR não é totalmente conhecido. As ribonucleases reconhecidas pela IR são proteínas secretadas, enquanto que a IR encontra-se exclusivamente no citoplasma. No entanto, a afinidade da IR tem sido demonstrada como determinante da citotoxicidade da ribonuclease, que só atua eliminando as células quando não está ligada a IR (DICKSON *et al.*, 2005).

Outra característica da proteína inibidora de ribonuclease é seu papel na angiogênese, formando um complexo com a angiogina, bloqueando sua atividade ribonucleotídica (DICKSON *et al.*, 2009).

As principais funções biológicas da IR seriam proteger as células, regulando ou bloqueando a atividade de ribonucleases com funções intracelulares conhecidas e monitorar o estado de oxidação das células em resposta a fatores como o envelhecimento e o estresse oxidativo (DICKSON *et al.*, 2005).

A proteína inibidora de ribonuclease apresentou valores de MM/ pI observados (50 kDa/ 4,74) muito próximos dos que eram esperados (51,8 kDa/ 4,71).

SELICHAROVÁ *et al.* (2007) compararam uma linhagem derivada de células progenitoras do câncer de mama e outra de epitélio mamário normal, e não

encontraram diferença de expressão da proteína inibidora de ribonuclease nas diferentes linhagens celulares.

7.5.10 Enzimas metabólicas

Outras proteínas identificadas pertencem à classe de **Enzimas metabólicas**, observando-se duas proteínas nessa categoria: **subunidade beta da ATP sintase mitocondrial** (banda 389) e **pirofosfatase inorgânica** (banda 594).

A subunidade beta da ATP sintase mitocondrial é codificada pelo gene *ATP5B* (*ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide*), localizado no cromossomo 12 (12p13). Esta enzima catalisa a síntese de ATP, utilizando um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana interna da mitocôndria durante a fosforilação oxidativa. A ATP sintase é composta por dois domínios estruturais: uma porção central catalítica (F1) e outra contendo o canal de prótons da membrana (F0), unidas por uma haste central e outra periférica. A porção catalítica da ATP sintase mitocondrial é formada por 5 diferentes subunidades (alfa, beta, gama, delta e épsilon) (NCBI, 2010).

De acordo com a simulação realizada através do banco de dados do *PhosphoSitePlus*, com base no ponto isoelétrico, sugere-se que a banda 389 representa a isoforma da subunidade beta da ATP sintase mitocondrial com dois resíduos fosforilados.

ALLDRIDGE *et al.* (2008) analisando amostras de tecido mamário tumoral e tecido normal adjacente observaram um aumento de expressão desta proteína nas amostras de carcinoma mamário. Enquanto que SELICHAROVÁ *et al.* (2007) comparando uma linhagem derivada de células progenitoras do câncer de mama e outra de epitélio mamário normal não encontraram diferença significativa de expressão da subunidade beta da ATP sintase entre as linhagens.

A pirofosfatase inorgânica codificada pelo gene *PPA1* (*pyrophosphatase/inorganic 1*) localizado no cromossomo 10 (10q11.1-q24), catalisa a hidrólise do pirofosfato em fosfato inorgânico, que é importante para o metabolismo do fosfato nas células.

SELICHAROVÁ *et al.* (2007) compararam uma linhagem de células tumorais e outra de epitélio mamário normal, e não encontraram diferença de expressão da pirofosfatase inorgânica nas diferentes linhagens celulares.

7.5.11 Proteínas com outras funções

Nesta categoria foram classificadas as proteínas que não apresentam uma função específica que pudessem ser agrupadas nas classes descritas acima. Foram identificadas as seguintes proteínas: **cadeia alfa-1 do colágeno VI** (seis isoformas) e **caspase 14** (banda 641).

A cadeia alfa-1 do colágeno VI foi a proteína que apresentou o maior número de isoformas. É codificada pelo gene *COL6A1* (*collagen, type VI, alpha 1*), localizado no cromossomo 21 (21q22.3). As bandas identificadas (87, 88, 89, 90, 91 e 93) (FIGURA 13) apresentaram uma pequena variação na massa molecular (134 a 137 kDa), entretanto estes valores diferiram do que era esperado para essa proteína (109,6 kDa). Essa variação pode ser resultado da imprecisão em determinar a massa de proteínas acima de 97 kDa, já que o marcador molecular utilizado não possui nenhuma marcação acima deste valor, fazendo com que o programa *ImageMastertm 2D Platinum v6.0* (GE Healthcare) não consiga estabelecer uma comparação totalmente confiável. Como era esperado, as isoformas apresentaram uma variação no ponto isoelétrico (5,15 a 5,34), que pode ser explicado por modificações pós-traducionais, especialmente fosforilações, segundo o banco de dados *UniProtKB/ Swiss-Prot*.

De acordo com a simulação realizada através do banco de dados do *PhosphoSitePlus*, com base no ponto isoelétrico, sugere-se que a banda 90 representa a proteína na sua forma não fosforilada, e as bandas 89, 88 e 87 seriam as isoformas com 1, 3 e 4 resíduos fosforilados respectivamente.

Os colágenos são uma superfamília de proteínas que desempenham papel na manutenção da integridade de vários tecidos. São encontrados na matriz extracelular e possuem um domínio triplo-hélice como elemento estrutural comum. O colágeno VI é o principal componente estrutural das microfibrilas e sua unidade estrutural básica é composta por heterodímeros de cadeias alfa-1 (VI), alfa-2 (VI) e alfa-3 (VI) (NCBI, 2010).

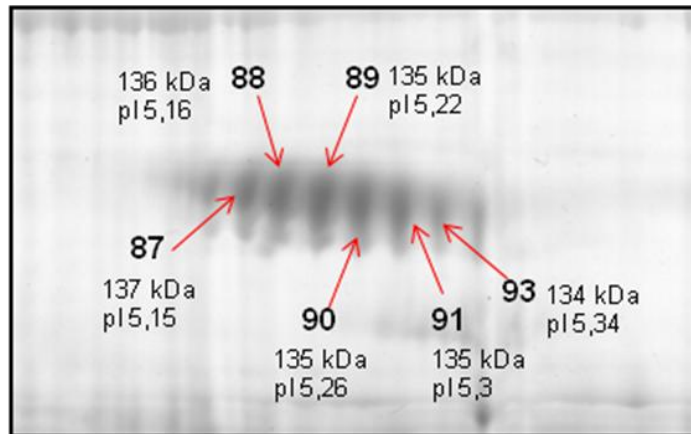


FIGURA 13 – DETALHE DAS BANDAS DA CADEIA ALFA-1 DO COLÁGENO VI

FONTE: O autor (2010)

As setas indicam as isoformas da proteína cadeia alfa-1 do colágeno VI (bandas 87, 88, 89, 90, 91 e 93), com seus respectivos valores de massa molecular (em quilodalton) e ponto isoelétrico.

WULFKUHLE *et al.* (2002) analisando amostras de carcinoma mamário ductal *in situ*, relataram esta proteína 2,4 vezes mais expressa no tecido normal adjacente do que na amostra tumoral.

A caspase-14 é codificada pelo gene *CASP14* (*caspase 14, apoptosis-related cysteine peptidase*), localizado no cromossomo 19 (19p13.1). Faz parte de uma grande família de proteases chamada de caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*). Em humanos já foram descritos 11 tipos funcionais, compondo um sistema proteolítico fundamental nos processos de regulação e responsáveis pela apoptose, que é crucial para o desenvolvimento e homeostase dos organismos multicelulares. Uma desregulação deste processo pode levar ao desenvolvimento de doenças autoimunes e câncer (KOENIG *et al.*, 2005).

Os membros da família caspase estão presentes como pró-enzimas inativas, que são ativadas por clivagem em resíduos de aspartato, gerando heterotetrâmeros ativos (p20/ p10). Embora a expressão da caspase-14 seja restrita a alguns tipos de células de mamíferos, a mesma foi detectada em várias linhagens de células tumorais (KOENIG *et al.*, 2005).

SELICHAROVÁ *et al.* (2007) compararam linhagens celulares progenitoras do câncer de mama e de epitélio mamário normal, encontrando a caspase-14 6,5 vezes mais expressa na linhagem neoplásica do que nas células normais.

8. CONCLUSÕES

Nos últimos anos a análise proteômica se tornou importante como um dos meios mais eficientes para o estudo funcional dos genes e das proteínas expressas. A aplicação da proteômica de tecidos tumorais é de relevância para o desenvolvimento de estudos comparativos, possibilitando a identificação de potenciais biomarcadores que poderão ser utilizados para auxiliar a detecção precoce e o diagnóstico da doença.

A implantação da metodologia proteômica no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética da UFPR possibilita mais uma linha de pesquisa no estudo do câncer de mama, integrando diferentes áreas, entre elas, genômica e transcriptômica, fornecendo dados para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares desta doença.

A partir das análises dos géis e identificação das proteínas, foi observado que algumas destas apresentaram isoformas resultantes provavelmente de modificações pós-traducionais. De acordo com a literatura, estas alterações apresentam um importante papel na regulação de diversos processos celulares. Portanto, os dados obtidos neste trabalho fornecem informações para futuros estudos, correlacionando estas modificações e seu envolvimento no desenvolvimento do câncer.

Os resultados deste trabalho permitiram a identificação e a criação de um banco de dados das proteínas mais frequentes na amostra de tecido mamário tumoral. Dentre as proteínas identificadas, algumas possuem funções associadas a mecanismos moleculares envolvidos na tumorigênese do câncer de mama, como, regulação da divisão celular, organização do citoesqueleto, detoxificação de carcinógenos, diferenciação, adesão e apoptose, justificando a importância do método na pesquisa do câncer. Entretanto, para se ter uma compreensão mais aprofundada do envolvimento destas proteínas no processo cancerígeno é necessária a complementação destes resultados com o estudo diferencial de expressão proteômica.

REFERÊNCIAS

ADAMS, J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. **Cancer Treatment Reviews**, v. 29, suppl. 1, p. 3-9, 2003.

AGARWAL, P. K.; MEHROTRA, A.; CHANDRA, T.; SINGH, K. Immunohistochemical localization of transferrin in human breast cancer tissue. **Indian Journal Pathol Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 441-447, 2000.

AKAKURA, N.; HOOGLAND, C.; TAKADA, Y. K.; SAEGUSA, J.; YE, X.; LIU, F. T.; CHEUNG, A. T.; TAKADA, Y. The COOH-terminal globular domain of fibrinogen gamma chain suppresses angiogenesis and tumor growth. **Cancer Research**, v. 66 n. 19, p. 9691-9697, 2006.

ALLDRIDGE, L.; METHODIEVA, G.; GREENWOOD, C.; AL-JANABI, K.; THWAITES, L.; SAUVEN, P.; METHODIEV, M. Proteome profiling of breast tumors by gel electrophoresis and nanoscale electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 4, p. 1458-1469, 2008.

ARDINI, E.; PESOLE, G.; TAGLIABUE, E.; MAGNIFICO, A.; CASTRONOVO, V.; SOBEL, M. E.; COLNAGHI, M. I.; MÉNARD, S. The 67-kDa laminin receptor originated from a ribosomal protein that acquired a dual function during evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, n. 8, p. 1017-1025, 1998.

AZAD, N. F.; RASOOL, N.; ANNUNZIATA, C. M.; MINASIAN, L.; WHITELEY, G.; KOHN, E. C. Proteomics in clinical trials and practice – present uses and future promise. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, n. 10, p. 1819-1829, 2006.

AWADALLAH, S. M.; ATOUM, M. F. Haptoglobin polymorphism in breast cancer patients from Jordan. **Clinica Chimica Acta**, v. 341, n. 1, p. 17-21, 2004.

BATEMAN, A. C. Breast pathology. **Surgery (Oxford)**, v. 25, p. 245-250, 2007.

BERKELMAN, T.; STENSTED, T. **2-D electrophoresis using immobilized pH gradients: principles and methods**. Edition AC (80-6429-60). Uppsala, Sweden: Amersham Biosciences Inc., 1998. Manual do fabricante. 100p.

BHARADWAJ, S.; PRASAD, G. L. Tropomyosin-1, a novel suppressor of cellular transformation is downregulated by promoter methylation in cancer cells. **Cancer Letters**, v. 183, n. 2, p. 205-213, 2002.

BHATTACHARYA, B.; PRASAD, G. L.; VALVERIUS, E. M.; SALOMON, D. S.; COOPER, H. L. Tropomyosins of human mammary epithelial cells: consistent defects of expression in mammary carcinoma cell lines. **Cancer Research**, v. 50, n. 7, p. 2105-2112, 1990.

BISCH, P. M. Proteômica. In: LUÍS MIR. (Org.). **Genômica**. 1. ed. São Paulo: Editora Atheneu. v. 1, p. 139-162, 2004.

BISHOP, J. M. Viral oncogenes. **Cell**, v. 42, p. 23-38, 1985.

BOSE, R.; MOLINA, H.; PATTERSON, A. S.; BITOK, J. K.; PERIASWAMY, B.; BADER, J. S.; PANDEY, A.; COLE, P. A. Phosphoproteomic analysis of Her2/neu signaling and inhibition. **Proc Natl Acad Sci**, v. 103, n. 26, p. 9773–9778, 2006.

BRADFORD, M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CALVO, K. R.; LIOTTA, L. A.; PETRICON, E. F. Clinical Proteomics: from biomarker discovery and cell signaling profiles to individualized personal therapy. **Bioscience Reports**, v. 25, n. 1, p. 107-125, 2005.

CASSIMERIS, L. The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 14, n. 1, p. 18-24, 2002.

CHABNER, B. A.; MURPHY, M. J. Jr. Breast cancer: a tale of two centuries: with implications for understanding cancer metastasis and cancer stem cell biology. **Oncologist**, vol. 10, n. 6, p. 369; 2005.

CHUTHAPISITH, S.; LAYFIELD, R.; KERR, I. D.; HUGHES, C.; EREMIN, O. Proteomic profiling of MCF-7 breast cancer cells with chemoresistance to different types of anti-cancer drugs. **International Journal of Oncology**, v. 30, p. 1545-1551, 2007.

CIOCCA, D. R.; CALDERWOOD, S. K. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. **Cell Stress Chaperones**, v. 10, n. 2, p. 86-103, 2005.

COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58.209 women with breast cancer and 101.986 women without the disease. **Lancet**, v. 358, p. 1389-1399, 2001.

COLLINS, J. A.; BLAKE, J. M.; CROSIGNANI, P. G. Breast cancer risk with postmenopausal hormonal treatment. **Human Reproduction Update**, v. 11, n. 6, p. 545-560, 2005.

COOPER, G. M. Elements of human cancer. **Jones and Bartlett Publishers**, 1994.

COURTILLOT, C.; PLU-BUREAU, G.; BINART, N.; BALLEYGUIER, C.; SIGAL-ZAFRANI, B.; GOFFIN, V.; KUTTENN, F.; KELLY, P. A.; TOURAINE, P. Benign breast diseases. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 10, n. 4, p. 325-335, 2005.

DAVIS, M. A.; HANASH, S. High-throughput genomic technology in research and clinical management of breast cancer: Plasma-based proteomics in early detection and therapy. **Breast Cancer Research**, v. 8, n. 6, p. 217-221, 2006.

DENG, S. S.; XING, T. Y.; ZHOU, H. Y.; XIONG, R. H.; LU, Y. G.; WEN, B.; LIU, S. Q.; YANG, H. J. Comparative proteome analysis of breast cancer and adjacent normal breast tissues in human. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 4, n. 3, p. 165-172, 2006.

DICKSON, K. A.; HAIGIS, M. C.; RAINES, R. T. Ribonuclease inhibitor: structure and function. **Prog Nucleic Acid Res Molecular Biology**, v. 80, p. 349-374, 2005.

DICKSON, K. A.; KANG, D. K.; KWON, Y. S.; KIM, J. C.; LELAND, P. A.; KIM, B. M.; CHANG, S. I.; RAINES, R. T. Ribonuclease inhibitor regulates neovascularization by human angiogenin. **Biochemistry**, v. 48, n. 18, p. 3804-3806, 2009.

DOZIER, J. H.; HISER, L.; DAVIS, J. A.; THOMAS, N. S.; TUCCI, M. A.; BENGHUZZI, H. A.; FRANKFURTER, A.; CORREIA, J. J.; LOBERT, S. Beta class II tubulin predominates in normal and tumor breast tissues. **Breast Cancer Res**, v. 5, n. 5, p. 157-169, 2003.

DUPONT, A.; CORSEAU, D.; DEKEYZER, O.; DROBECQ, H.; GUIHOT, A. L.; SUSEN, S.; VINCENNELLI, A.; AMOUYEL, P.; JUDE, B.; PINET, F. The proteome and secretome of human arterial smooth muscle cells. **Proteomics**, v. 5, p. 585-596, 2005.

FARLEY, A. R.; LINK, A. J. Identification and quantification of protein posttranslational modifications. **Methods in Enzymology**, v. 463, p. 725-763, 2009.

FERGUSON, A. T.; EVRON, E.; UMBRIGHT, C. B.; PANDITA, T. K.; CHAN, T. A.; HERMEKING, H.; MARKS, J. R.; LAMBERS, A. R.; FUTREAL, P. A.; STAMPFER, M. R.; SUKUMAR, S. High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 sigma locus leads to gene silencing in breast cancer. **Proc Natl Acad Sci**, v. 97, n. 11, p. 6049-6054, 2000.

FEY, S. J.; LARSEN, P. M. 2D or not 2D. Two-dimensional gel electrophoresis. **Curr Opin Chem Biol**, v. 5, n. 1, p. 26-33, 2001.

FRANZÉN, B.; LINDER, S.; ALAIYA, A. A.; ERIKSSON, E.; URUY, K.; HIRANO, T.; OKUZAWA, K.; AUER, G. Analysis of polypeptide expression in benign and malignant human breast lesions: down-regulation of cytokeratins. **British Journal of Cancer**, v. 74, n. 10, p. 1632-1638, 1996.

FU, H.; SUBRAMANIAN, R. R.; MASTERS, S. C. 14-3-3 Proteins: structure, function, and regulation. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, n. 40, p. 617-647, 2000.

GALLETTA, B. J.; CHUANG, D. Y.; COOPER, J. A. Distinct roles for Arp2/3 regulators in actin assembly and endocytosis. **PLoS Biology**, v. 6, n. 1, p. 72-85, 2008.

GARNIS, C.; BUYS, T. P.; LAM, W. L. Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. **Molecular Cancer**, v. 3, n. 9, 2004.

GE HEALTHCARE – HANDBOOK. **2-D Electrophoresis: Principles and Methods**. Suécia: Ed. Elanders Tofters, 2004. 162p.

GEHO, D. H.; PETRICON, E. F.; LIOTTA, L. A. Blasting into the microworld of tissue proteomics: a new window on cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 3, p. 825-827, 2004.

GERKE, V.; MOSS, S. E. Annexins: from structure to function. **Physiol Rev**, v. 82, n. 2, p. 331-371, 2002.

GORDON, H. Oncogenes. **Mayo Clin Proc.**, v. 60, p. 697-713, 1985.

GÖRG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; HARDER, A.; SCHEIBE, B.; WILDGRUBER, R.; WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 21, n. 6, p. 1037-1053, 2000.

GRAVES, R. P.; HAYSTEAD, T. A. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 1, p. 39-63, 2002.

GUO, Y.; FU, Z.; EYK, J. E. V. A proteomic primer for the clinician. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 4, n. 1, p. 9-17, 2007.

HAMRITA, B.; CHAHED, K.; TRIMECHE, M.; GUILLIER, C. L.; HAMMANN, P.; CHAÏEB, A.; KORBI, S.; CHOUCANE, L. Proteomics-based identification of alpha1-antitrypsin and haptoglobin precursors as novel serum markers in infiltrating ductal breast carcinomas. **Clinica Chimica Acta**, v. 404, n. 2, p. 111-118, 2009.

HARTSOUGH, M. T.; STEEG, P. S. Nm23/nucleoside diphosphate kinase in human cancers. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 32, n. 3, p. 301-308, 2000.

HEASMAN, S. J.; RIDLEY, A. J. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 9, p. 690-701, 2008.

HELFAND, B. T.; CHOU, Y. H.; SHUMAKER, D. K.; GOLDMAN, R. D. Intermediate filament proteins participate in signal transduction. **Trends in Cell Biology**, v. 15, n. 11, p. 568-570, 2005.

HELMBRECHT, K.; ZEISE, E.; RENSING, L. Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. **Cell Prolif**, v. 33, n. 6, p. 341-365, 2000.

HEMERT, M. J.; STEENSMA, H. Y.; HEUSDEN, G. P. H. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signaling and apoptosis. **Bioessays**, v. 23, n. 10, p. 936-946, 2001.

HERBERT, B. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 20, n. 4, p. 660-663, 1999.

HOD, Y. Differential control of apoptosis by DJ-1 in prostate benign and cancer cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 92, n. 6, p. 1221-1233, 2004.

HONDERMARCK, H.; DOLLÉ, L.; YAZIDI-BELKOURA, I. E.; VERCOUTTER-EDOUART, A. S.; ADRIAENSSENS, E.; LEMOINE, J. Functional proteomics of breast cancer for signal pathway profiling and target discovery. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 7, n. 4, p. 395-405, 2002.

HONDERMARCK, H. Breast cancer – when proteomics challenges biological complexity. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 2, p. 281-291, 2003.

HONDERMARCK, H.; TASTET, C.; YAZIDI-BELKOURA, I. E.; TOILLON, R. A.; BOURHIS, X. L. Proteomics of breast cancer: The quest for markers and therapeutic targets. **Journal of proteome research**, v. 7, n. 4, p. 1403-1411, 2008.

HUDELIST, G.; SINGER, C. F.; PISCHINGER, K. I.; KASERER, K.; MANAVI, M.; KUBISTA, E.; CZERWENKA, K. F. Proteomic analysis in human breast cancer: identification of a characteristic protein expression profile of malignant breast epithelium. **Proteomics**, v. 6, n. 6, p. 1989-2002, 2006.

HUGHES, L. E.; MANSEL, R. E.; WEBSTER, D. J. T. Benign disorders and diseases of the breast – concepts and clinical management. **W. B. Saunders**, v. 2, p. 7-20, 2000.

INCA/MS: Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde. Estimativa 2010 – Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em <www.inca.gov.br>. Acesso em: março de 2010.

INGENBLEEK, Y.; YOUNG, V. Transthyretin (prealbumin) in health and disease: nutritional implications. **Annu Rev Nutr**, v. 14, p. 495-533, 1994.

JIN, H.; ZANGAR, R. C. Protein modifications as potential biomarkers in breast câncer. **Biomarker Insights**, v. 4, p. 191-200, 2009.

JOLLY, C.; MORIMOTO, R. I. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 19, p. 1564-1572, 2000.

JUPE, E. R.; LIU, X. T.; KIEHLBAUCH, J. L.; MCCLUNG, J. K.; DELL'ORCO, R. T. Prohibitin in breast cancer cell lines: loss of antiproliferative activity is linked to 3' untranslated region mutations. **Cell Growth Differentiation**, v. 7, n. 7, p. 871-878, 1996.

KANG, S. H.; KANG, K. W.; KIM, K. H.; KWON, B.; KIM, S. K.; LEE, H. Y.; KONG, S. Y.; LEE, E. S.; JANG, S. G.; YOO, B. C. Upregulated HSP27 in human breast cancer cells reduces Herceptin susceptibility by increasing Her2 protein stability. **BMC Cancer**, v. 8, p. 286-295, 2008.

KANO, T.; SAKAI, M.; MURAMATSU, M. Structure and expression of a human class pi glutathione S-transferase messenger RNA. **Cancer Research**, v. 47, n. 21, p. 5626-5630, 1987.

KARIHTALA, P.; MÄNTYNIEMI, A.; KANG, S. W.; KINNULA, V. L.; SOINI, Y. Peroxiredoxins in breast carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 9, p. 3418-3424, 2003.

KIM, R. H.; PETERS, M.; JANG, Y.; SHI, W.; PINTILIE, M.; FLETCHER, G. C.; DELUCA, C.; LIEPA, J.; ZHOU, L.; SNOW, B.; BINARI, R. C.; MANOUKIAN, A. S.; BRAY, M. R.; LIU, F. F.; TSAO, M. S.; MAK, T. W. DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. **Cancer Cell**, v. 7, n. 3, p. 263-273, 2005.

KLAUNIG, J. E.; XU, Y.; ISENBERG, J. S.; BACHOWSKI, S.; KOLAJA, K. L.; JIANG, J.; STEVENSON, D. E.; WALBORG, E. F. JR. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, suppl. 1, p. 289-295, 1998.

KOENIG, U.; SOMMERGRUBER, W.; LIPPENS, S. Aberrant expression of caspase-14 in epithelial tumors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 335, n. 2, p. 309-313, 2005.

KOSTENKO, S.; MOENS, U. Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 20, p. 3289-3307, 2009.

LACOMBE, M. L.; MILON, L.; MUNIER, A.; MEHUS, J. G.; LAMBETH, D. O. The human Nm23/nucleoside diphosphate kinases. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 32, n. 3, p. 247-258, 2000.

LARONGA, C.; DRAKE, R. R. Proteomic approach to breast cancer. **Cancer Control**, v. 14, n. 4, p. 360-368, 2007.

LARSEN, M. R.; ROEPSTORFF, P. Mass spectrometric identification of proteins and characterization of their post-translational modifications in proteome analysis. **Fresenius J Anal Chem**, v. 366, n. 6, p. 677-690, 2000.

LAUDANSKI, K.; WYCZECHOWSKA, D. The distinctive role of small heat shock proteins in oncogenesis. **Arch Immunol Ther Exp**, v. 54, n. 2, p. 103-111, 2006.

LE NAOUR, F.; MISEK, D. E.; KRAUSE, M. C.; DENEUX, L.; GIORDANO, T. J.; SCHOLL, S.; HANASH, S. M. Proteomics-based identification of RS/DJ-1 as a novel circulating tumor antigen in breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 7, n. 11, p. 3328-3335, 2001.

LIEBLER, D. C. Introduction to proteomics: tools for the new biology. **Humana Press**, p. 198, 2002.

LIU, Y.; LIU, H.; HAN, B.; ZHANG, J. T. Identification of 14-3-3 sigma as a contributor to drug resistance in human breast cancer cells using functional proteomic analysis. **Cancer Research**, v. 66, n. 6, p. 3248-3255, 2006.

LUMB, R. A.; BULLEID, N. J. Is protein disulfide isomerase a redox-dependent molecular chaperone?. **EMBO Journal**, v. 21, n. 24, p. 6763-6770, 2002.

LUO, Y.; ZHANG, J.; LIU, Y.; SHAW, A. C.; WANG, X.; WU, S.; ZENG, X.; CHEN, J.; GAO, Y.; ZHENG, D. Comparative proteome analysis of breast cancer and normal breast. **Molecular Biotechnology**, v. 29, p. 233-244, 2005.

MAITRA, A.; WISTUBA, I. I.; WASHINTONG, C.; VIRMANI, A. K.; ASHFAQ, R.; MILCHGRUB, S.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D. High-resolution chromosome 3p allelotyping of breast carcinomas and precursor lesions demonstrates frequent loss of heterozygosity and a discontinuous pattern of allele loss. **Am J Pathol**, v. 159, p. 119-130, 2001.

MALORNI, L.; CACACE, G.; CUCCURULLO, M.; POCSFALVI, G.; CHAMBERY, A.; FARINA, A.; DI MARO, A.; PARENTE, A.; MALORNI, A. Proteomic analysis of MCF-7 breast cancer cell line exposed to mitogenic concentration of 17beta-estradiol. **Proteomics**, v. 6, n. 22, p. 5973-5982, 2006.

MARTIN, D. B.; NELSON, P. S. From genomics to proteomics: techniques and applications in cancer research. **Trends in Cell Biology**, v. 11, n. 11, p. 60-64, 2001.

MCKEAN, P. G.; VAUGHAN, S.; GULL, K. The extended tubulin superfamily. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 1723-1733, 2001.

MICHALAK, M.; CORBETT, E. F.; MESAELI, N.; NAKAMURA, K.; OPAS, M. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. **Biochem Journal**, v. 344, p. 281-292, 1999.

MINAFRA, I. P.; CANCEMI, P.; FONTANA, S.; MINAFRA, L.; FEO, S.; BECCHI, M.; FREYRIA, A. M.; MINAFRA, S. Expanding the protein catalogue in the proteome reference map of human breast cancer cells. **Proteomics**, v. 6, p. 2609-2625, 2006.

MOSESSON, M. W. Fibrinogen and fibrin structure and functions. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, n. 8, p. 1894-1904, 2005.

NANDI, S.; GUZMAN, R. C.; YANG, J. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: A unifying hypothesis. **Proc Natl Acad Sci**, v. 25, n. 92, p. 3650-3657, 1995.

NCBI: National Center for Biotechnology Information. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: março de 2010.

NOH, D. Y.; AHN, S. J.; LEE, R. A.; KIM, S. W.; PARK, I. A.; CHAE, H. Z.; Overexpression of peroxiredoxin in human breast cancer. **Anticancer Research**, v. 21, n. 3B, p. 2085-2090, 2001.

NUSSBAUM, R. L.; McINNIS, R. R.; WILLARD, H. F. Thompson & Thompson Genetics in Medicine. 6 ed. W.B. Saunders Company, 2001.

OAKLEY, B. R.; An abundance of tubulins. **Trends Cell Biology**, v. 10, n. 12, p. 537-542, 2000.

OLDENBURG, R. A.; MEIJERS-HEIJBOER, H.; CORNELISSE, C. J.; DEVILLE, P. Genetic susceptibility for breast cancer: How many more genes to be found? **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 63, p. 125-149, 2007.

ONG, S. E.; PANDEY, A. An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. **Biomolecular Engineering**, v. 8, n. 5, p. 195-205, 2001.

OU, K.; YU, K.; KESUMA, D.; HOOI, M.; HUANG, N.; CHEN, W.; LEE, S. Y.; GOH, X. P.; TAN, L. K.; LIU, J.; SOON, S. Y.; RASHID, S. B. A.; PUTTI, T. C.; JIKUYA, H.; ICHIKAWA, T.; NISHIMURA, O.; SALTO-TELLEZ, M.; TAN, P. Novel breast cancer biomarkers identified by integrative proteomic and gene expression mapping. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 4, p. 1518-1528, 2008.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, p. 837-846, 2000.

PARK, S.; YOON, S. Y.; KIM, K. E.; LEE, H. R.; HUR, D. Y.; SONG, H.; KIM, D.; BANG, S. I.; CHO, D. H. Interleukin-18 induces transferrin expression in breast cancer cell line MCF-7. **Cancer Letters**, v. 286, n. 2, p. 189-195, 2009.

PARKIN, D. M.; BRAY, F. I.; DEVESA, S. S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **European Journal of Cancer**, v. 37, p. 4-66, 2001.

PÉREZ-LÓPEZ, F. R.; CHEDRAUI, P.; HAYA, J. Vitamin D acquisition and breast cancer risk. **Reproductive Sciences**, v. 16, p. 7-19, 2009.

PIETROWSKA, M.; MARCZAK, L.; POLANSKA, J.; BEHRENDT, K.; NOWICKA, E.; WALASZCZYK, A.; CHMURA, A.; DEJA, R.; STOBIECKI, M.; POLANSKI, A.; TARNAWSKI, R.; WIDLAK, P. Mass spectrometry-based serum proteome pattern analysis in molecular diagnostics of early stage breast cancer. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, n. 60, p. 1-13, 2009.

RAMOS, C. M. P.; BORA, P. S. Functional characterization of acetylated Brazil nut (*Bertholletia excels* HBK) kernel globulin. **Ciência Tecnologia Aliment.**, v. 24, n. 1, p. 134-138, 2004.

RAO, A. K.; ZIEGLER, Y. S.; McLEOD, I. X.; YATES, J. R.; NARDULLI, A. M. Effects of Cu/Zn superoxide dismutase on estrogen responsiveness and oxidative stress in human breast cancer cells. **Molecular Endocrinology**, v. 22, n. 5, p. 1113-1124, 2008.

RICHARDSON, P. G.; MITSIADES, C.; HIDEHIMA, T.; ANDERSON, K. C. Proteasome inhibition in the treatment of cancer. **Cell Cycle**, v. 4, n. 2, p. 290-296, 2005.

ROCHA, T. L. *et al.* Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. **Comunicado Técnico Embrapa**, 2005. 11p.

SAEED, S. A.; AHMAD, N.; AHMED, S. Dual inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase by human haptoglobin: its polymorphism and relation to hemoglobin binding. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 353, n. 4, p. 915-920, 2007.

SALZANO, A. M.; CRESCENZI, M. Mass spectrometry for protein identification and the study of post translational modifications. **Ann Ist Super Sanita**, v. 41, n. 4, p. 443-450, 2005.

SATO, T.; SAKAMOTO, T.; TAKITA, K.; SAITO, H.; OKUI, K.; NAKAMURA, Y. The human prohibitin (PHB) gene family and its somatic mutations in human tumors. **Genomics**, v. 17, n. 3, p. 762-764, 1993.

SELICHAROVÁ, I.; SMUTNÁ, K.; SANDA, M.; UBIK, K.; MATOUSKOVÁ, E.; BURSÍKOVÁ, E.; BROZOVÁ, M.; VYDRA, J.; JIRÁČEK, J. 2-DE analysis of a new human cell line EM-G3 derived from breast cancer progenitor cells and comparison with normal mammary epithelial cells. **Proteomics**, v. 7, n. 9, p. 1549-1559, 2007.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. Fundamentos de genética. 4 ed. Editora Guanabara Koogan S.A., 2008.

SOMIARI, R. I.; SULLIVAN, A.; RUSSELL, S.; SOMIARI, S.; HU, H.; JORDAN, R.; GEORGE, A.; KATENHUSEN, R.; BUCHOWIECKA, A.; ARCIERO, C.; BRZESKI, H.; HOOKE, J.; SHRIVER, C. High-throughput proteomic analysis of human infiltrating ductal carcinoma of the breast. **Proteomics**, v. 3, n. 10, p. 1863-1873, 2003.

SOMIARI, R. I.; SOMIARI, S.; RUSSELL, S.; SHRIVER, C. D. Proteomics of breast carcinoma. **Journal of Chromatography B**, v. 815, p. 215-225, 2005.

SRINIVAS, P. R.; KRAMER, B. S.; SRIVASTAVA, S. Trends in biomarker research for cancer detection. **The Lancet Oncology**, v. 2, p. 698-704, 2001.

SUGIMURA, T. Cancer prevention: past, present, future. **Mutat Res**, v. 402, p. 7-14, 1998.

THIEFFRY, D.; SARKAR, S. Forty years under the central dogma. **Trends Biochem Science**, v. 23, n. 8, p. 312-316, 1998.

THOMAS, P. A.; KIRSCHMANN, D. A.; CERHAN, J. R.; FOLBERG, R.; SEFTOR, E. A.; SELLERS, T. A.; HENDRIX, M. J. C. Association between keratin and vimentin expression, malignant phenotype, and survival in postmenopausal breast cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v. 5, p. 2698-2703, 1999.

TNM: Estadiamento dos tumores de mama. SPCC - Hospital São Marcos Clínica de Ginecologia e Mastologia UICC – União Internacional Contra o Câncer - TNM 6^a edição.

TRASK, D. K.; BAND, V.; ZAJCHOWSKI, D. A.; YASWEN, P.; SUH, T.; SAGER, R. Keratins as markers that distinguish normal and tumor-derived mammary epithelial cells. **Proc Natl Acad Sci**, v. 87, p. 2319-2323, 1990.

URUNO, T.; LIU, J.; ZHANG, P.; FAN, Y. X.; EGILE, C.; LI, R.; MUELLER, S. C.; ZHAN, X. Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 3, p. 259-266, 2001.

VALPUESTA, J. M.; MARTÍN-BENITO, J.; GÓMEZ-PUERTAS, P.; CARRASCOSA, J. L.; WILLISON, K. R. Structure and function of a proteoin folding machine: the eukaryotic cytosolic chaperonin CCT. **FEBS Letters**, v. 529, n. 1, p. 11-16, 2002.

VERCOUTTER-EDOUART, A. S.; LEMOINE, J.; LE BOURHIS, X.; LOUIS, H.; BOILLY, B.; NURCOMBE, V.; RÉVILLION, F.; PEYRAT, J. P.; HONDERMARCK, H. Proteomic analysis reveals that 14-3-3 sigma is down-regulated in human breast cancer cells. **Cancer Research**, v. 61, n. 1, p. 76-80, 2001.

VYHLIDAL, C.; LI, X.; SAFE, S. Estrogen regulation of transferrin gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. **J Mol Endocrinol**, v. 29, n. 3, p. 305-317, 2002.

WANG, J. W.; PENG, S. Y.; LI, J. T.; WANG, Y.; ZHANG, Z. P.; CHENG, Y.; CHENG, D. Q.; WENG, W. H.; WU, X. S.; FEI, X. Z.; QUAN, Z. W.; LI, J. Y.; LI, S. G.; LIU, Y. B. Identification of metastasis-associated proteins involved in gallbladder carcinoma metastasis by proteomic analysis and functional exploration of chloride intracellular channel 1. **Cancer Letters**, v. 281, n. 1, p. 71-81, 2009.

WEINBERG, R. A. The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. **Science**, v. 230, p. 770-776, 1985.

WEINBERG, R. A. Tumor suppressor genes. **Science**, v. 254, p. 1138-1145, 1991.

WEISEL, J. W. Fibrinogen and fibrin. **Advances in Protein Chemistry**, v. 70, p. 247-299, 2005.

WESTERMARCK, J.; KÄHÄRI, V. M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. **FASEB Journal**, v. 13, n. 8, p. 781-792, 1999.

WESTERMEIER, R. Sensitive, quantitative, and fast modifications for coomassie blue staining of polyacrylamide gels. **Practical Proteomics**, v. 6, suppl. 2, p. 61-64, 2006.

WEYDERT, C. J.; WAUGH, T. A.; RITCHIE, J. M.; IYER, K. S.; SMITH, J. L.; LI, L.; SPITZ, D. R.; OBERLEY, L. W. Overexpression of manganese or copper-zinc superoxide dismutase inhibits breast cancer growth. **Free Radic Biol Med**, v. 41, n. 2, p. 226-237, 2006.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; WILLIAMS K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. Current challenges and future applications for protein maps post-translational vector maps in proteome projects. **Electrophoresis**, v. 17, n. 5, p. 830-838, 1996.

WILKINS, M. R.; WILLIAMS, K. L.; APPEL, R. D.; HOCHSTRASSER, D. F. (Eds.) **Proteome research: New frontiers in Functional Genomics**. Berlin: Editora Springer-Verlag, 1997. 243 p.

WILKINSON, B.; GILBERT, H. F. Protein disulfide isomerase. **Biochim Biophys Acta**, v. 1699, n. 1-2, p. 35-44, 2004.

WILLIPINSKI-STAPELFELDT, B.; RIETHDORF, S.; ASSMANN, V.; WOELFLE, U.; RAU, T.; SAUTER, G.; HEUKESHOVEN, J.; PANTEL, K. Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells. **Clinical Cancer Res**, v. 11, n. 22, p. 8006-8014, 2005.

WRIGHT, R. M.; McMANAMAN, J. L.; REPINE, J. E. Alcohol-induced breast cancer: a proposed mechanism. **Free Radic Biol Med**, v. 26, n. 3-4, p. 3448-354, 1998.

WULFKUHLE, J. D.; SGROI, D. C.; KRUTZSCH, H.; MCLEAN, K.; MCGARVEY, K.; KNOWLTON, M.; CHEN, S.; SHU, H.; SAHIN, A.; KUREK, R.; WALLWIENER, D.; MERINO, M. J.; PETRICIOIN, E. F.; ZHAO, Y.; STEEG, P. S. Proteomics of human breast ductal carcinoma in situ. **Cancer Res**, v. 62, n. 22, p. 6740-6749, 2002.

WULFKUHLE, J. D.; LIOTTA, L. A.; PETRICON, E. F. Proteomic applications for the early detection of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 4, p. 267-275, 2003.

YAMAZAKI, D.; KURISU, S.; TAKENAWA, T. Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. **Cancer Sci**, v. 96, n. 7, p. 379-386, 2005.

ZHANG, B.; ZHANG, Y.; DAGHER, M. C.; SHACTER, E. Rho GDP Dissociation Inhibitor Protects Cancer Cells against Drug-Induced Apoptosis. **Cancer Research**, v. 65, n. 14, p. 6054-6072, 2005.

ZHANG, B. Rho GDP dissociation inhibitors as potential targets for anticancer treatment. **Drug Resist Updat**, v. 9, n. 3, p. 134-141, 2006.

ZHANG, D.; LIM, S. G.; KOAY, E. S. C. Proteomic identification of down-regulation of oncoprotein DJ-1 and proteasome activator subunit 1 in hepatitis B virus-infected well-differentiated hepatocellular carcinoma. **Int J Oncol**, v. 31, n. 3, p. 577-584, 2007.

ZHU, K.; ZHAO, J.; LUBMAN, D. M.; MILLER, F. R.; BARDER, T. J. Protein pI shifts due to posttranslational modifications in the separation and characterization of proteins. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 9, p. 2745-2755, 2005.

APÊNDICE

Tabela das proteínas identificadas

Nome da proteína	Nome oficial <i>UniprotKB</i>	ID	ppm	ΔMM	ΔpI
Cadeia alfa-1 do colágeno VI	Collagen alpha-1(VI) chain (CO6A1)	87	100	25,00	0,11
		88	200	24,09	0,1
		89	100	23,18	0,04
		90	100	23,18	0
		91	100	23,18	0,04
		93	100	22,26	0,08
Sorotransferrina	Serotransferrin (TRFE)	175	50	7,19	0,01
		180	100	8,45	0,06
Calreticulina	Calreticulin (CARL)	248	200	43,15	0,16
Proteína 1 complexo-T subunidade épsilon	T-complex protein 1 subunit epsilon (TCPE)	304	100	6,49	0,24
Alfa-1-Antitripsina	Alpha-1-Antitrypsin (A1AT)	306	200	30,06	0,3
		322	50	27,93	0,25
Proteína dissulfeto-isomerase	Protein disulfide-isomerase (PDIA1)	309	50	9,57	0,09
Tubulina cadeia alfa-1B	Tubulin alpha-1B chain (TBA1B)	317	200	18,11	0,28
Proteína dissulfeto-isomerase A3	Protein disulfide-isomerase A3 (PDIA3)	335	50	3,33	0,01
Tubulina cadeia beta	Tubulin beta chain (TBB5)	354	100	13,77	0,26
Proteína dissulfeto-isomerase A6	Protein disulfide-isomerase A6 (PDIA6)	384	100	11,34	0,24
Subunidade beta da ATP sintase mitocondrial	ATP synthase subunit beta, mitochondrial (ATPB)	389	100	6,19	0,12
Cadeia gama do fibrinogênio	Fibrinogen gamma chain (FIBG)	393	200	3,65	0,55
Proteína tipo-actina 3	Actin-related protein 3 (ARP3)	406	100	10,88	0,29
Actina citoplasmática 1; Actina citoplasmática 2	Actin, cytoplasmic 1 (ACTB); Actin, cytoplasmic 2 (ACTG)	420	100	9,52	0,11
			100	9,26	0,09
		431	100	9,52	0,16
			100	9,26	0,14
		468	100	7,14	0,01
			100	6,89	0,01
		490	100	4,76	0,04
			100	4,51	0,06
Inibidor da ribonuclease	Ribonuclease inhibitor (RINI)	432	100	3,47	0,03
Proteína ribossomal 40S	40S ribosomal protein SA (RSSA)	467	50	39,82	0,06
Vimentina	Vimentin (VIME)	494	150	18,06	0,19
		946	150	13,59	0,06
Queratina do citoesqueleto tipo I – 19	Keratin, type I cytoskeletal 19 (K1C19)	504	50	2,49	0,03
Haptoglobina	Haptoglobin (HPT)	506	100	6,32	0,79
Tropomiosina cadeia alfa-4	Tropomyosin alpha-4 chain (TPM4)	557	100	36,36	0,01
		611	100	15,38	0,04
Tropomiosina cadeia alfa-1	Tropomyosin alpha-1 chain (TPM1)	586	50	13,15	0,06
		599	50	7,03	0,06

Nome da proteína	Nome oficial <i>UniProtKB</i>	ID	ppm	ΔMM	Δpl
Pirofosfatase inorgânica	Inorganic pyrophosphatase (IPYR)	594	150	8,76	0,21
Anexina A5	Annexin A5 (ANXA5)	605	100	5,56	0,1
Anexina A4	Annexin A4 (ANXA4)	608	50	5,82	0,12
Tropomiosina cadeia alfa-3	Tropomyosin alpha-3 chain (TPM3)	617	50	0,61	0,09
Proteína canal de cloro intracelular 1	Chloride intracellular channel protein 1 (CLIC1)	620	50	21,32	0,18
Complexo ativador do proteassoma subunidade 2	Proteasome activator complex subunit 2 (PSME2)	624	50	16,36	0,12
Proteína 14-3-3 épsilon	14-3-3 protein épsilon (1433E)	628	50	9,22	0,04
Complexo ativador do proteassoma subunidade 1	Proteasome activator complex subunit 1 (PSME1)	632	100	7,27	0,18
Proteína 14-3-3 gama	14-3-3 protein gamma (1433G)	635	50	9,15	0,02
Proteína 14-3-3 teta	14-3-3 protein theta (1433T)	637	100	10,71	0,03
Proibitina	Prohibitin (PHB)	640	50	4,03	0,12
Caspase-14	Caspase-14 (CASPE)	641	200	11,11	0,18
Proteína 14-3-3 zeta/ delta	14-3-3 protein zeta/delta (1433Z)	645	50	7,53	0,03
Proteína <i>heat shock</i> beta-1	Heat shock protein beta-1 (HSPB1)	654	100	31,58	0,2
		655	50	31,58	0,19
Peroxiredoxina-6	Peroxiredoxin-6 (PRDX6)	668	100	15,54	0,67
Inibidor de dissociação Rho GDP 1	Rho GDP-dissociation inhibitor 1 (GDIR1)	669	50	25,00	0,07
Glutathione S-transferase P	Glutathione S-transferase P (GSTP1)	693	100	14,41	0,32
Proteína DJ-1	Protein DJ-1 (PARK7)	695	100	30,00	0,14
Peroxiredoxina-2	Peroxiredoxin-2 (PRDX2)	707	50	13,64	0,09
Nucleotídeo difosfato quinase A	Nucleoside diphosphate kinase A (NDKA)	725	50	27,17	0,25
Superóxido dismutase (Cu/Zn)	Superoxide dismutase [Cu-Zn] (SODC)	734	50	24,22	0,24
Transtiretina	Transthyretin (TTHY)	766	200	6,25	0,18

NOTA: **ppm** – partes por milhão; tolerância utilizada na identificação de cada uma das bandas. Os parâmetros ΔMM e Δpl foram utilizados com base no trabalho de DUPONT *et al.* (2005). Os nomes oficiais foram indicados pelo banco de dados *UniProtKB/ Swiss-Prot*.

ANEXOS

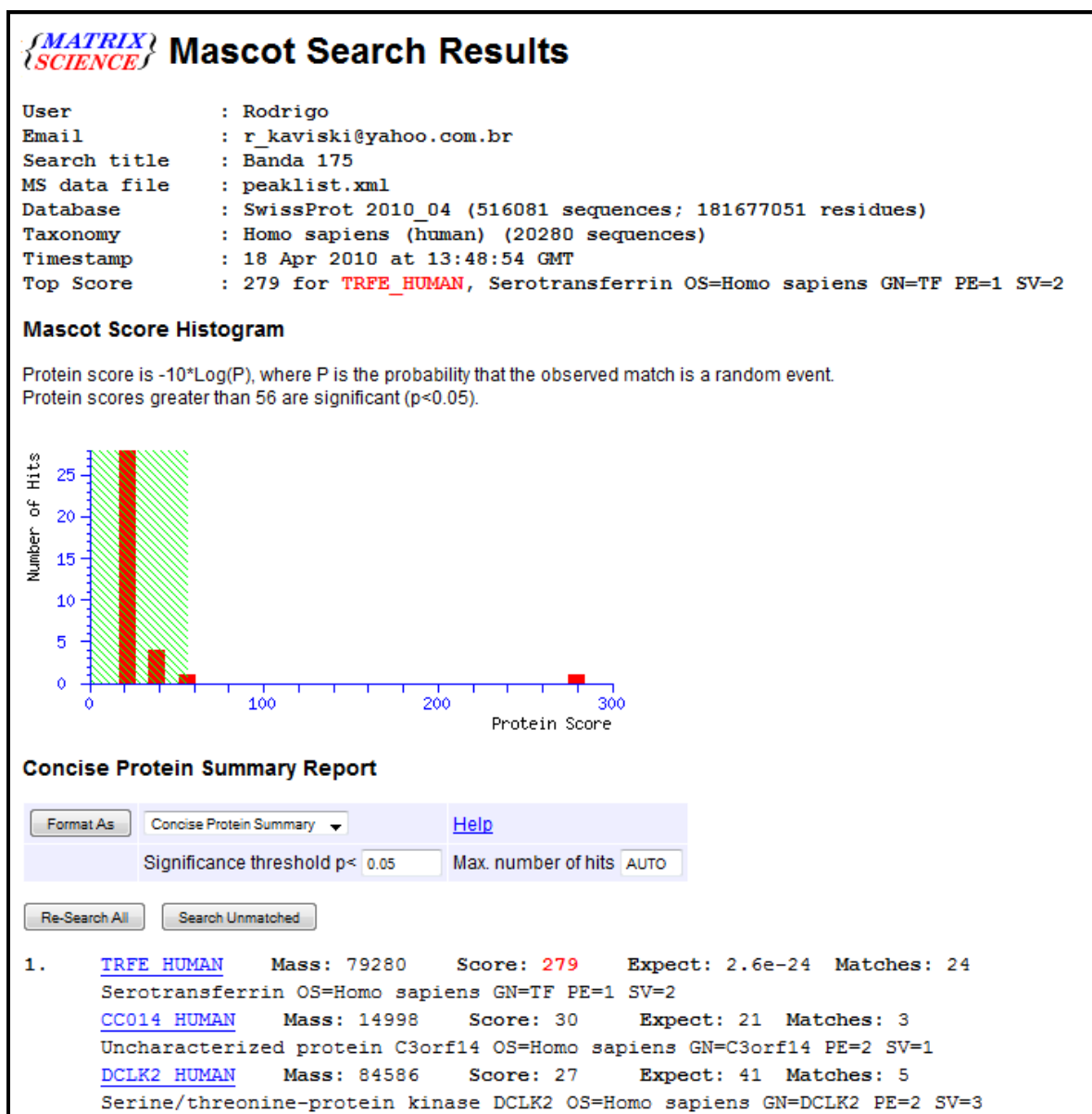
ANEXO 01	Interface do programa de busca MASCOT.....	115
ANEXO 02	Exemplo de identificação protéica.....	116
ANEXO 03	Dados complementares da identificação.....	117

ANEXO 01 – Interface do programa de busca MASCOT

MASCOT Peptide Mass Fingerprint

Your name	<input type="text" value="Rodrigo"/>	Email	<input type="text"/>
Search title	<input type="text" value="Banda 175"/>		
Database(s)	<div> SwissProt NCBI nr contaminants MSDB </div>	Enzyme	Trypsin ▾
		Allow up to	1 ▾ missed cleavages
Taxonomy Homo sapiens (human) ▾		
Fixed modifications	<div> Carbamidomethyl (C) </div>	> <	<div> Acetyl (K) Acetyl (N-term) Acetyl (Protein N-term) Amidated (C-term) Amidated (Protein C-term) Ammonia-loss (N-term C) Biotin (K) Biotin (N-term) Carbamyl (K) Carbamyl (N-term) Carboxymethyl (C) </div>
	Display all modifications <input type="checkbox"/>		
Variable modifications	<div> Oxidation (M) </div>	> <	
Protein mass	<input type="text"/> kDa	Peptide tol. ±	50 ppm ▾
Mass values	<input checked="" type="radio"/> MH ⁺ <input type="radio"/> M _r <input type="radio"/> M-H ⁻		
	Monoisotopic <input checked="" type="radio"/> Average <input type="radio"/>		
Data file	<input type="text" value="I:\espectrometria de massa\zip"/> <input type="button" value="Enviar arquivo..."/>		
Query NB Contents of this field are ignored if a data file is specified.	<div style="border: 1px solid black; height: 80px;"></div>		
Decoy	<input type="checkbox"/>		
	Report top	AUTO ▾ hits	
<input type="button" value="Start Search ..."/>		<input type="button" value="Reset Form"/>	

ANEXO 02 – Exemplo de identificação protéica



ANEXO 03 - Dados complementares da identificação